Wachstumshormonrezeptoren an Lymphozyten des Menschen

Nachweis, Charakterisierung und klinische Anwendung

Wieland Kiess

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534927_0021

WACHSTUMSHORMONREZEPTOREN AN LYMPHOZYTEN DES MENSCHEN - NACHWEIS, CHARAKTERISIERUNG UND KLINISCHE ANWENDUNG

Wieland Kiess

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital

Direktor: Prof. Dr. med. H.-B. Hadorn

WACHSTUMSHORMONREZEPTOREN AN LYMPHOZYTEN DES MENSCHEN - NACHWEIS, CHARAKTERISIERUNG UND KLINISCHE ANWENDUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wieland Kiess

Schwenningen am Neckar

1984

MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. O. Butenandt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. H.-B. Hadorn
	Prof. Dr. med. K. von Werder
	Prof. Dr. med. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 1984

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit entstand in der Kinderklinik der Universität München im Dr. von Haunerschen Kinderspital, Direktor: Prof. Dr. med. H.-B. Hadorn, auf Anregung von Herrn Prof. Dr. med. O. Butenandt. Für die jederzeitige und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und viele wertvolle Hinweise möchte ich ihm herzlich danken.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Endokrinologischen Labors der Universitätskinderklinik München (Prof. Dr. med. D. Knorr) und der Medizinischen Innenstadtklinik der Universität München (Prof. Dr. med. K. von Werder) danke ich vielmals für die freundliche Aufnahme und die vielen nützlichen Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit. Frau A. Rüdisser danke ich besonders für jede erdenkliche Hilfe und die Geduld, die sie während meiner Arbeit im Labor bewies.

Für die stets freundliche Unterstützung im Immunologischen Labor der GSF, Landwehrstraße, München (Dr. med. B. Netzel), im Immunologischen Labor der Universitätskinderklinik München (PD. Dr. med. R. Eife), in den Klinischen Labors der Universitätskinderklinik München (Prof. Dr. med. F. Bidlingmaier) und im Hämatologischen Forschungslabor der I. Medizinischen Klinik rechts der Isar, München (Prof. Dr. med. U. Fink) danke ich allen Beteiligten sehr.

Herrn Dr. med. G. Stalla und Herrn Dr. med. T. Eversmann (Medizinische Klinik Innenstadt, Universität München) danke ich für die freundschaftliche Hilfe und wertvolle Hinweise. Frau I. Beranek und Herrn Dr. med. König (SFB 51, Datenverarbeitung, Medizinische Klinik Innenstadt, Universität München) bin ich für ihren enormen Einsatz bei allen statistischen Auswertungen dankbar.

Herrn H. Holtmann (Immunologisches Labor der Universitätskinderklinik München) danke ich sehr für sein kritisches Interesse an dieser Arbeit, für vielerlei Anregungen und tatkräftige Unterstützung bei immunologischen Fragen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Fragestellung	1
1.2. Endokrinologische Grundlagen	2
1.3. Arbeitshypothesen	5
2. Grundversuche	8
2.1. Inkubationsmedien	8
2.2. Zellzahlabhängigkeit	10
2.3. Lebendigkeit der Zellen	12
2.4. Tracer	14
2.4.1. Traceralter	14
2.4.2. Big-hGH	14
2.4.3. Tracerreinigung	16
2.4.4. LPO-, Chloramine-T-Markierung	20
2.5. Hormondissoziation	21
2.6. Re-Expression	22
3. Rezeptorcharakterisierung	26
3.1. Theorie	26
3.2. Tracersättigung	27
3.3.1. Temperaturabhängigkeit	27
3.3.2. Zeit- und Temperaturkinetik	29
3.4. Ionenabhängigkeit	31
3.4.1. Zweiwertige Kationen	31
3.4.2. Einwertige Kationen	33
3.4.3. pH-Abhängigkeit	35
3.5. Reproduzierbarkeit und Präzision	37
3.6. Interferenzen	41
3.7. Vergleich verschiedener Rezeptorsysteme	43
3.8. Charakterisierung der Rezeptor-tragenden Zelle	44
3.8.1. Granulozyten, Erythrozyten, Milzzellen	44
3.8.2. Mononukleäre Zellen, Lymphozyten, Monozyten	45

Seite

3.8.3. Zellkulturen 48
3.8.4. T-Lymphozyten 48
3.9. Spezifität 51

4. Rezeptorregulation und Rezeptormodulation 54

4.1. Theorie 54
4.2.1. Vorinkubationsdauer 54
4.2.2. Temperaturkinetik der Vorinkubation 55
4.3.1. Vorinkubation mit Hormonen 57
4.3.2. Kinetik der Hormonvorinkubation 58
4.4.1. Vorinkubation mit Trypsin und Antitrypsin 60
4.4.2. Kinetik der Antitrypsinvorinkubation 61
4.4.3. Inkubation mit Trypsin und Antitrypsin 64
4.4.4. Kinetik der Antitrypsininkubation 65
4.5. Vorinkubation mit sogenanntem SM-B 68
4.6.1. Vorinkubation mit Mitogenen 71
4.6.2. Mitogen-induzierte Lymphoblastentransformation 73

5. Klinische Untersuchungen 76

5.1.1. Gesunde Probanden 76
5.1.2. Altersabhängigkeit 77
5.1.3. Geschlechtsabhängigkeit 77
5.2.1. Patienten 80
5.2.2. Akromegalie 81
5.2.3. Hypophysärer Minderwuchs vor und nach Therapie 82
5.3. ALL 85

6. Diskussion 87

6.1. Fragestellung 87
6.2. Methodik 89

Seite

6.3. Rezeptorcharakterisierung 93
6.4. Rezeptorregulation und Rezeptormodulation 98
6.5. Klinische Untersuchungen 102
6.6. Funktionelle Bedeutung des Rezeptors 106

7. Zusammenfassung 108

8. Summary 111

9. Anhang 113

9.1. Material und Methodik 113
9.1.1. Material 113
9.1.1.1. Puffer und Medien 113
9.1.1.2. Hormonpräparate und Enzyme 113
9.1.1.3. Geräte 115
9.1.2. Methodik 115
9.1.2.1. Zellseparationsmethoden 115
9.1.2.1.1. Lymphozytenseparation 115
9.1.2.1.2. Granulozyten- und Erythrozytenseparation 116
9.1.2.1.3. Monozytenseparation 118
9.1.2.1.4. T-Zellseparation 118
9.1.2.1.5. Lymphoblastenkulturen 119
9.1.2.2. Hormonmarkierung 120
9.1.2.2.1. Laktoperoxidase 120
9.1.2.2.2. Chloramine-T 120
9.1.2.3. Lymphozyten-RRA 121
9.1.2.3.1. Prinzip 121
9.1.2.3.2. Standardansatz 121
9.1.2.4. Plasmamembran-RRA 122

Seite

9.1.2.4.1. Membranpräparation 122

9.1.2.4.2. Standardansatz 124

9.1.2.5. Mathematische Methoden 124

9.1.2.5.1. Scatchard Plots 124

9.1.2.5.2. Statistische Methoden 125

9.2. Literaturverzeichnis 126

9.3. Tabellen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AET	2-Amino-Äthyl-Isothiuroniumbromid
ALL	Akute Lymphoblastische Leukose
B_O	Gesamtbindung (Total Binding)
BSA	Bovines Serumalbumin
B-Zellen	Bursa-Äquivalent abhängige Lymphozyten
Con A	Concanavalin A
cpm	counts per minute
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GF	Wachstumsfaktoren
GH	Wachstumshormon (Somatotropin)
GH-IF = SRIF	Somatostatin
GH-RF	Somatotropin-Releasing Hormon
K_a	Assoziationskonstante
KIE	Kallikrein Inhibierende Einheit
LH	Luteinisierendes Hormon
LH-RH = GnRH	Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon
LPO	Laktoperoxidase
MBK	Maximale Bindungskapazität
N	Anzahl der Probanden/Tests
PHA	Phytohaemagglutinin
PRL	Prolaktin
RIA	Radioimmunassay
RRA	Radiorezeptorassay
rpm	rounds per minute
SD	Standardabweichung
SM	Somatomedin
SM-B	Somatomedin-B
TdR	Thymidyldesoxyribonukleinsäure
TRH	Thyreotropin-Releasing Hormon
TSH	Thyreotropin
T-Zellen	Thymus abhängige Lymphozyten
VK	Variationskoeffizient

STICHWORTVERZEICHNIS

	Seite
Akromegalie	5, 81, 104
Akute Lymphoblastenleukose	85, 105
Altersabhängigkeit	77, 80, 102, 103
Antitrypsin	60, 64, 100
Assoziationskonstante	5, 26, 95
Big-Hormon	2, 14, 16, 96
Blastentransformation	48, 73, 85, 88, 92, 99, 105
B-Zellen	48
Dissoziation	21, 27, 29, 91, 98
Down-Regulation	58, 100, 103
Endokrinologie	2
Enzyme	10, 54, 60, 99, 100, 113
Erythrozyten	44, 116
Geschlechtsabhängigkeit	76, 77, 80, 102
Gonadotropine	51, 113
Granulozyten	44, 116
Historisches	2
Hormonmarkierung	14, 20, 120
Hormonwirkung	3, 92, 101, 106
Hypophyse	2, 4, 51, 107
Hypopituitarismus	4, 81
Hypothalamus	3, 51, 107
Inkubationsbedingungen	8, 27, 29, 31, 88, 94, 113
Insulin	5, 31, 33, 35, 44, 51, 57, 83, 96, 101
Interferenzen	41, 93
Internalisation	5, 29, 53, 98
Kationen	31, 89, 94
Little-Hormon	2, 14, 16, 20, 96
Lymphoblasten	5, 48, 73, 85, 90, 105, 119
Lymphozyten	1, 6, 44, 48, 85, 87, 97, 115

	Seite
Membranrezeptoren	1, 43, 54, 98
Minderwuchs	4, 82, 104
Mitogene	48, 54, 71, 99
Mononukleäre Zellen	5, 45, 87, 92, 97, 115
Monozyten	5, 44, 45, 118
Nachweisgrenze	3, 95
Patienten	4, 80, 103
pH-Wert	31, 35, 94
Plausibilität	43
Präzision	37, 41
Praktikabilität	87
Prolaktin	52, 57, 58, 101
Proteohormone	1, 5, 51, 57, 80, 87, 101, 106
Radioimmunoassay	2
Radiorezeptorassay	5, 8, 89, 121, 122
Re-Expressionszeit	22, 88
Reproduzierbarkeit	37, 41
Rezeptor	1, 5, 26, 54, 87, 92, 98, 106
Rezeptorcharakterisierung	5, 26, 54, 93
Rezeptordefekt	5, 80, 87, 104
Rezeptormodell	98, 106
Rezeptorregulation	54, 98
Scatchard Plot	22, 124
Sensitivität	3, 95
Somatomedine	4, 68, 107
Somatomedin-B	68, 107
Spezifität	5, 41, 51, 87, 96
Standardabweichung	38, 76
Standardansatz	121, 124
Steroidhormone	22, 57, 101
Temperaturkinetik	6, 27, 29, 55, 91, 94
Therapie	4, 82, 104
T-Lymphozyten	48, 97, 118

	Seite
Total Binding (Gesamtbindung)	37
Tracerkinetik	27, 94
Tracerreinigung	16, 96
Trypsin	41, 60, 64, 93, 100
Unspezifische Bindung	29, 38, 52
Variationskoeffizient	37, 76, 80
Vorinkubation	54, 57, 60, 68, 71, 99
Wachstum	2, 4, 71, 106
Wachstumsfaktoren	4, 68, 107
Wachstumshormon	2
Wachstumsregulation	4, 70, 106
Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	77, 85, 125
Zeitkinetik	6, 29, 55, 58, 61, 65
Zellfunktion	74, 106
Zellkulturen	6, 48, 73, 99
Zellproliferation	73, 92

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Seite

Abb. 1: Bindung von ^{125}J-hGH an Lymphozyten in verschiedenen Inkubationsmedien. 9

Abb. 2: Bindung von ^{125}J-hGH an Lymphozyten in Abhängigkeit von der Zellkonzentration im Assay. 11

Abb. 3: Dissoziation von gebundenem ^{125}J-hGH in Abhängigkeit von der Zeit. 13

Abb. 4: Reinigung von little-hGH-Tracer über Lymphozytenrezeptoren - Untersuchungsgang. 17

Abb. 5: Rechromatographieprofil nach Reinigung von little-hGH-Tracer über Lymphozytenrezeptoren. 18

Abb. 6: Bindung von gereinigtem little-hGH-Tracer an Lymphozyten. 19

Abb. 7: Absterbekurve von Lymphozyten nach der Zellseparation. 23

Abb. 8: Rezeptor-Re-Expression in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen Zellseparation und RRA. 24

Abb. 9: Sättigungskurve des hGH-Rezeptors an Lymphozyten. 28

Abb. 10: Bindung von ^{125}J-hGH an Lymphozyten in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur und der Inkubationsdauer. 30

Abb. 11: Verdrängungskurven von gebundenem ^{125}J-hGH in Abhängigkeit von der Calcium-Konzentration des Inkubationsmediums. 32

Abb. 12: Verdrängungskurven von gebundenem ^{125}J-hGH in Abhängigkeit von der Magnesium-Konzentration des Inkubationsmediums. 34

Seite

Abb. 13: Verdrängungskurven von gebundenem ^{125}J-hGH in Abhängigkeit von der Natrium-Konzentration des Inkubationsmediums. 36

Abb. 14: Verdrängungskurve von gebundenem ^{125}J-hGH-Standard-. 39

Abb. 15: Verdrängungskurven von gebundenem ^{125}J-hGH - hypophysäre Hormone -. 40

Abb. 16: Bindung von ^{125}J-hGH an Lymphozyten - Interferenzen durch Rinderserumalbumin und Trypsin. 42

Abb. 17: Verdrängungskurven für gebundenes ^{125}J-hGH an verschiedenen im Blut zirkulierenden Zellen. - I. 46

Abb. 18: Verdrängungskurven für gebundenes ^{125}J-hGH an verschiedenen im Blut zirkulierenden Zellen. - II. 47

Abb. 19: Verdrängungskurven von gebundenem ^{125}J-hGH an T-Zellpräparationen. 50

Abb. 20: ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphozyten in Abhängigkeit von der Vorinkubation der Zellen. 56

Abb. 21: ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphozyten nach Vorinkubation der Zellen mit verschiedenen Hormonen. 59

Abb. 22: ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphozyten nach Vorinkubation mit Antitrypsin. 62

Abb. 23: Verdrängungskurven für gebundenes ^{125}J-hGH nach Vorinkubation mit Trypsin und Antitrypsin. 63

Abb. 24: Bindungskinetik von ^{125}J-hGH an Lymphozyten bei Inkubation mit Trypsin und Antitrypsin. 66

Seite

Abb. 25: Verdrängungskurven für gebundenes ^{125}J-hGH bei Inkubation mit Antitrypsin und Trypsin - Scatchard Graphs -. 67

Abb. 26: Verdrängungskurven von gebundenem ^{125}J-hGH nach Vorinkubation mit SM-B und Anti-SM-B-Antiserum. 69

Abb. 27: ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphozyten nach Vorinkubation mit SM-B. 70

Abb. 28: Wachstumsregulation durch hGH - hypothetischer Regelkreis auf Rezeptorebene. 72

Abb. 29: Verdrängungskurven für gebundenes ^{125}J-hGH nach Mitogenexposition und Blastentransformation. 75

Abb. 30: ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphozyten von Patienten mit hypophysärem Minderwuchs: vor und nach Therapie mit hGH. 78

Abb. 31: ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphozyten. Korrelation der MBK mit dem Alter gesunder männlicher Lymphozytenspender. 79

Abb. 32: ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphozyten von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen. 84

Abb. 33: Dichtegradienten-Separation nach Boyum. Zellfraktionen nach Zentrifugation. 117

Abb. 34: Radiorezeptorassay - Bindungsversuch 123

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Proteohormon-Rezeptor-Studien (Literaturüberblick)

Tab. 2: Rezeptorstudien mit Wachstumsfaktoren (GFs) (Literaturüberblick)

Tab. 3: Rezeptorstudien mit menschlichem Wachstumshormon (Literaturüberblick)

Tab. 4: Wachstumsfaktoren (growth factors) (Literaturüberblick)

Tab. 5: Pathologie des Wachstumshormons (Übersicht)

Tab. 6: Flußdiagramm 'Versuchsaufbau'

Tab. 7: Bindung von ^{125}J-hGH an lebenden und vorbehandelten, toten Zellen

Tab. 8: Bindung von Big- und Little-hGH-Tracer an mononukleären Zellen - Verdrängungsparameter von Little-hGH in Abhängigkeit vom Traceralter
I. Little-hGH-Tracer II. Big-hGH-Tracer

Tab. 9: Bindungsparameter bei Bindung von verschiedenen ^{125}J-hGH-Fraktionen der Markierungsrechromatographie bei Verdrängung mit Little-hGH (Crescormon^{R})

Tab. 10: Charakteristika zweier Markierungstechniken für hGH mittels ^{125}J

Tab. 11: Re-Expression der Rezeptoren in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen Zellseparation und Bindungsassay

Tab. 12: Bindung von ^{125}J-hGH an Lymphozyten in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

Tab. 13: Intrapersonalassays der ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphozyt
I. Gesunde weibliche Versuchsperson, 23 Jahre
II. Gesunde männliche Versuchsperson, 25 Jahre

Tab. 14: Bindung von ^{125}J-hGH an verschiedenen Rezeptor-tragenden Systemen

Tab. 15: Bindung von ^{125}J-hGH an zirkulierenden Blutzellen gesunder Probanden

Tab. 16: ^{125}J-hGH-Bindung an mononukleären, zirkulierenden Zellen gesunder Probanden

Tab. 17: Bindung von ^{125}J-hGH an Lymphoblastenkulturen

Tab. 18: Bindung von ^{125}J-hGH an Lymphoblastenkulturen (Mitogen-transformiert)

Tab. 19: ^{125}J-hGH-Bindung an T-Lymphozytenpopulationen gesunder Probanden

Tab. 20: Bindungsparameter von Verdrängungskurven hypothalamischer Peptidhormone für an mononukleäre Zellen gebundenes ^{125}J-hGH

Tab. 21: Bindungsparameter von Verdrängungskurven hypophysärer Proteohormone für an mononukleäre Zellen gebundenes ^{125}J-hGH

Tab. 22: Bindungsparameter von Verdrängungskurven von Proteohormonen für an mononukleäre Zellen gebundenes ^{125}J-hGH

Tab. 23: Bindungsparameter von ^{125}J-hGH bei Verdrängung mit verschiedenen hGH-Präparationen

Tab. 24: Bindung von ^{125}J-hGH in Abhängigkeit von der Vorinkubationsdauer

Tab. 25: Bindung von ^{125}J-hGH in Abhängigkeit von der Vorinkubation mit Proteohormonen

Tab. 26: Bindung von ^{125}J-hGH in Abhängigkeit von der Vorinkubation mit Antitrypsin

Tab. 27: Bindung von ^{125}J-hGH an Lymphozyten in Abhängigkeit von der Antitrypsin-Konzentration im Inkubationsmedium

Tab. 28: hGH-Bindung nach Vorinkubation mit SM-B und Anti-SM-B-Antiserum

Tab. 29: Mitogeninduzierte Lymphoblastentransformation und ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphoblasten (vier Tage Inkubation)

Tab. 30: Mitogeninduzierte Lymphoblastentransformation und ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphoblasten (sieben Tage Inkubation)

Tab. 31: Bindung von ^{125}J-hGH an mononukleären Zellen verschiedener Probandengruppen

Tab. 32: Bindung von ^{125}J-hGH an mononukleären Zellen gesunder Probanden in Abhängigkeit vom Geschlecht

Tab. 33: Assoziationskonstanten für die ^{125}J-hGH-Bindung an mononukleären Zellen von Patienten mit hGH-Mangel

Tab. 34: Radiorezeptorassay mit mononukleären Zellen - Standardansatzschema

---

Anmerkung:
Die in einigen Tabellen aufgeführte Spalte '% verdrängbar '25' ' bezeichnet den Prozentsatz gebundenen ^{125}J-hGH, der durch 25 ng unmarkiertes hGH verdrängt werden kann.

1. Einleitung

1.1. Fragestellung

Einzeller bilden Peptide, die den Proteohormonen der Vertebraten entsprechen (265). Proteohormone wiederum besitzen bei verschiedenen Vertebraten nahezu identische Aminosäurensequenzen. Die zellulären Angriffspunkte dieser Wirkstoffe unterscheiden sich bei verschiedenen Spezies kaum in ihrer Struktur. Es wird außerdem vermutet, daß auch in verschiedenen Organen desselben Organismus dasselbe Rezeptormolekül für ein bestimmtes Proteohormon vorhanden ist (109). Nachdem in der Vergangenheit in einigen tierischen und menschlichen Geweben Proteohormonrezeptoren nachgewiesen wurden, wird heute hypothetisch eine Vielzahl von ähnlichen Rezeptorsystemen in anderen Geweben vermutet und in zunehmendem Maße nachgewiesen (Tab. 1, 2, 3).

Besonders für das Wachstumshormon sind Rezeptoren in einer Reihe von tierischen und menschlichen Geweben beschrieben (Tab. 3). Die Frage, ob menschliche Lymphozyten hGH spezifisch an ihrer Oberfläche binden, ist allerdings noch nicht beantwortet: Während zwei Arbeitsgruppen an Hand ihrer Versuchsergebnisse die Existenz von hGH-Rezeptoren an peripheren Lymphozyten annehmen (97, 117), konnten andere Untersucher keine spezifische Bindung von Wachstumshormonen an Lymphozyten des Menschen finden (148).

FÜR DIE VORLIEGENDE ARBEIT STELLT SICH SO DIE FRAGE, OB MENSCHLICHE LYMPHOZYTEN AN IHRER OBERFLÄCHE REZEPTOREN FÜR hGH BESITZEN ODER NICHT.

1.2. Endokrinologische Grundlagen

Untersuchungen über menschliches Wachstum sind seit mehr als 2000 Jahren belegt (293). Erste Berichte über die Existenz des GH beim Menschen liegen 70 Jahre zurück (242). Und erst vor 25 Jahren gelang es, GH aus menschlichen Hypophysen zu gewinnen. Unterschiedliche Verfahren zur Gewinnung und Reinigung des Hormons wurden beschrieben (212, 242, 261). Seit 1979 ist es möglich, GH über Rekombinanten-DNA industriell in großem Maßstab herzustellen (37, 121, 151, 224).

Gegenstand neuerer Forschung war es auch, die Heterogenität des hypophysären und im Plasma zirkulierenden GH aufzudecken: Höher- ('big') und niedermolekulare ('little') Formen des Hormons (30, 110, 127, 226, 289) sowie mögliche Hormonvorstufen (111, 287) sind nachgewiesen und scheinen sowohl in vivo als auch in vitro ineinander konvertiert zu werden (26, 29, 124, 128, 288). Während mindestens vier verschiedene GH-Formen unterschieden werden (314), bleibt die Rolle der einzelnen Wachstumshormonformen bis heute ungeklärt (27).

Verschiedene Fragmente des little-hGH-Moleküls wiederum sind auf ihre antigene Wirksamkeit im RIA (200, 232, 252, 317) und auf ihre biologische Aktivität im Bioassay (46, 250) untersucht worden. Es wird von manchen Untersuchern vermutet, daß solche Fragmente das eigentlich biologisch wirksame Hormonpotential darstellen (19, 282).

Das intakte little-GH-Molekül ist hinsichtlich seiner Konformation (Sekundärstruktur) und seiner Anordnung im Raum (Tertiärstruktur) ungenügend charakterisiert. Bekannt dagegen ist die Primärstruktur des menschlichen Wachstumshormons: Eine im Vergleich zu anderen Proteohormonen lange Peptidkette von 191 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 22500 Dalton und einem isoelektri-

schen Punkt von pH 4.9 ist über zwei Disulfidbrücken in sich vernetzt (201). In Lösung besteht ein starker Trend zu weiteren Vernetzungen mit Dimer- und Aggregatbildung (223), eine Tatsache, die die Heterogenität des GH in in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen verständlicher macht.

Eine wichtige Besonderheit des menschlichen GH ist seine Speziesspezifität: Während einige tierische Proteohormone (Insulin, Parathormon, Calcitonin) beim Menschen biologisch aktiv sind und in der Therapie hormoneller Defizite sogar menschlichen Hormonen vorgezogen werden (291), gilt es als sicher, daß beim Menschen nur menschliches GH biologische Aktivität besitzt (47, 185).

Menschliches Wachstumshormon besitzt andererseits durchaus biologische Aktivität in anderen Spezies. Diese Tatsache wurde in Bioassays zum Nachweis des Hormons benutzt (96, 299). An Stelle des Bioassays werden heute in endokrinologischen Laboratorien radioimmunologische Verfahren zum Nachweis von Proteohormonen eingesetzt (305, 313). Ausgehend von den ersten Beschreibungen des Radioimmunassays für hGH (273), ergaben sich Methoden mit hoher Spezifität und Sensitivität (57, 99). Die Entwicklung monoklonaler, nur gegen hGH gerichteter Antikörper schließt heute die Mitreaktion von anderen Proteohormonen (z.B. PRL) im RIA nahezu aus und senkt die Nachweisgrenze des Hormons auf unter ein ng/ml (45).

Trotz exakter Nachweismethoden und geklärter Primärstruktur ist die Physiologie und Pathophysiologie des hGH bis heute wenig geklärt. Viele Charakteristika der hGH-Sekretion sind zwar bekannt (66, 192, 311): Eine Reihe verschiedenster Stimuli der hGH-Sekretion (1, 39, 49, 94, 136) und einige Inhibitoren derselben (79) sind charakterisiert. Neue Erkenntnisse über die renale Exkretion des Hormons (243) und die Rolle des zirkadianen hGH-Sekretionsmusters bei der

Wachstumskontrolle (155, 162) müssen aber noch ergänzt werden.

Ähnlich vieldeutig wie die Ergebnisse der hGH-Sekretionsforschung sind die Resultate von Untersuchungen über die Wirkung des Hormons: Seit der Entdeckung und Charakterisierung der Somatomedine (80, 304) und anderer Wachstumsfaktoren (Tab. 4) ist die direkt das Wachstum stimulierende Wirkung des GH umstritten: Während einige Autoren (53, 92, 93, 160, 162, 245) heute wieder eine direkte Wirkung des hGH auf das Knochenwachstum und auf das zelluläre Wachstum anderer Organe annehmen, berichten andere Arbeitsgruppen, daß nur Somatomedine (= GH-abhängige Wachstumsfaktoren) in in-vitro-Systemen wie Fibroblasten-, Lymphoblasten- und HeLa-Zellkulturen Wachstumsphänomene induzieren (67, 81, 138, 191, 297).

Wie Somatomedine und/oder GH ihre wachstumsfördernde Wirkung ausüben, ist bis heute nicht bekannt. Allgemein gilt für hGH, daß eine Gewebsspezifität des Hormons fehlt. Eher scheint das GH in das generell im Organismus angelegte Wachstumsmuster einzugreifen (123, 191, 306). Intrazelluläre Prozesse wie die Generation von cAMP (231, 292), der Ribonukleinsäurestoffwechsel (254), die Metabolisierung von Aminosäuren (267, 277) und deren Akkumulation in der Zelle (306) scheinen von der Sekretion oder Zirkulation des hGH abzuhängen.

Entsprechend sind heute bei einer Reihe von Krankheiten, die mit Wachstumsauffälligkeiten oder Besonderheiten in der GH-Bildung oder -Sekretion einhergehen, pathogenetische Zusammenhänge mit hGH gesichert, bei einigen anderen vorerst nur postuliert (Tab. 5). Unbestritten sind heute die Therapieerfolge bei der Behandlung des hypophysären Minderwuchses mit hGH (32, 34, 48, 248).

1.3. Arbeitshypothesen

Die Bindung eines Hormons an Rezeptoren seines Zielgewebes wird heute als erster Schritt jeder Hormonaktion angesehen (71, 133, 230, 266). Rezeptoren sind dabei als Zellstrukturen definiert, die Liganden spezifisch erkennen, binden und auf das Signal 'Ligandbindung' einen biologischen Effekt auslösen (77, 169).

Am Beispiel von Insulin-Rezeptoren, dem am besten untersuchten Proteohormon-Rezeptor-System, wurden mathematische Größen zur Charakterisierung der Ligand-Rezeptor-Interaktion entwickelt: Assoziationskonstanten, Bindungskapazität des Rezeptors und Spezifität der Hormonbindung (76, 178, 275). Die Internalisierung des Insulin-Rezeptor-Komplexes (58, 132, 134), Membranveränderungen nach Absättigung der Rezeptoren (119, 183) und mögliche biologische Effekte wie die Beeinflußung von Enzymsystemen (72, 82) oder Substrattransportwegen (78) sind als Merkmale der Insulin-Rezeptor-Interaktion bekannt. Von diesen theoretischen Erkenntnissen ausgehende klinische Untersuchungen zeigten inzwischen, daß Veränderungen an Insulin-Rezeptoren bei verschiedenen endokrinen Erkrankungen eine Rolle spielen: Sowohl bei der Akromegalie des Menschen (220) und insulin-resistenten Formen des Diabetes mellitus des Menschen (7) als auch beim insulin-resistenten Diabetes der Maus (167) wurden Insulin-Rezeptor-Defekte beschrieben. Erhöhte Bindungskapazität des Insulinrezeptors in der Leber von Hamstern mit Insulinmangel scheint dagegen auf die Rolle des Rezeptors als Regulationsinstanz bei Hormonmangel hinzuweisen (142, 236).

In zunehmendem Maße wurden für Insulin-Rezeptorstudien im Blut zirkulierende Lymphozyten, Monozyten, Mischpopulationen aus beiden Zellarten (= mononukleäre Zellen) und Lymphoblastenlinien (z.B. IM-9-Lymphoblasten) benutzt (Tab. 1). Die Verwendung von lebenden, im Blut zirkulierenden Zellen

bietet dabei folgende Vorteile:

1. In Gegensatz zu vielen anderen Rezeptorassays, die tierische Gewebe als Rezeptor-tragende Systeme benutzen, stellen Untersuchungen mit mononukleären Zellen in-vitro-Untersuchungen mit lebenden, menschlichen Zellen dar.
2. Mononukleäre Zellen sind leicht und jederzeit zu gewinnen.
3. Blutabnahmen sind auch für Kinder und Kranke noch tolerabel.
4. Pathophysiologische Zusammenhänge beim Menschen können deshalb untersucht werden.
5. Relativ einfache Kulturmöglichkeiten und etablierte Labormethoden erleichtern die Planung und Durchführung von Rezeptorstudien.

Auf Grund der Vorteile, die Rezeptorstudien mit menschlichen Blutzellen bieten, versuchten verschiedene Untersucher auch für menschliches GH Rezeptorassays an Laborzellinien oder frisch separierten Zellen aufzubauen (Tab. 3). Während RRAs mit Zellkulturen (IM-9-Lymphoblasten) zur Standardmethode in der hGH-Rezeptorforschung geworden sind (36, 264), ist bis heute unklar (s.o.), ob aus peripherem Venenblut gewonnene Lymphozyten hGH spezifisch binden oder nicht. Arbeitsgruppen, die hGH-Rezeptoren an Lymphozyten gefunden zu haben glaubten (97, 117, 126), haben bis heute diesen hypothetischen Rezeptor ungenügend charakterisiert: Weder wurde über Regulationsphänomene an diesem Rezeptor berichtet, noch sind die mathematischen (Assoziationskonstanten, Variationskoeffizienten und Spezifität) und biochemischen Größen (Ionenabhängigkeit, Temperaturkinetiken) dieser GH-Rezeptor-Bindung ausreichend untersucht. Erste klinische Untersuchungen mit Lymphozytenrezeptoren für hGH hat nur eine Arbeitsgruppe (117) durchgeführt. Ein theoretisches

Konzept, das klinische Befunde, Regulationsphänomene und mögliche Rezeptor-vermittelte Hormonwirkungen überzeugend erklärt, ist nie beschrieben worden.

Die vorliegende Arbeit geht entsprechend davon aus, daß, falls spezifische hGH-Rezeptoren an Lymphozyten vorhanden sind, fünf Fragenkomplexe bearbeitet werden müssen (Tab. 6). Die Behandlung dieser Fragen baut in sich auf und erfolgt so in der beschriebenen Reihenfolge.

2. Grundversuche

Detaillierte Beschreibungen von Methoden zur Bestimmung von Proteohormonrezeptoren liegen vor (36, 264, 266). Eigene methodische Vorversuche mußten diese Standardarbeiten aber ergänzen, da in der Literatur widersprüchliche methodische Angaben zur Bindung von hGH an peripheren menschlichen Lymphozyten gemacht werden (97, 148, 264). Die hier beschriebenen Grundversuche ermöglichten die Entwicklung eines sensitiven und spezifischen Verfahrens zum Nachweis von hGH-Rezeptoren an peripheren menschlichen Lymphozyten (siehe Kap. 9.1.2.3.).

2.1. Inkubationsmedien

Arbeitsgruppen, die hGH-Rezeptoren an Lymphozyten untersucht haben, haben unterschiedliche Inkubationsmedien für hGH-RRAs benutzt (97, 148). Unterschiedliche Bindungsergebnisse lassen sich möglicherweise hierauf zurückführen. Die Bindung von ^{125}J-hGH an Lymphozyten gesunder Probanden wurde deshalb unter standardisierten Bedingungen (siehe Kap. 9.1.2.3.) in vier verschiedenen Inkubationsmedien untersucht.

Die Bindungsergebnisse mit Tris-Assaypuffer (196, 264) waren dabei deutlich höher als vergleichbare Werte mit anderen Inkubationsmedien (Abb. 1). Die spezifische Bindung (durch nicht radioaktives hGH verdrängbarer Anteil des gebundenen ^{125}J-hGH) war um das drei- bis zwölffache, die Assoziationskonstante um das 1,5- bis fünffache erhöht.

Der Tris-Assaypuffer wurde deshalb nach weiteren Untersuchungen über die Bedeutung von Ionenmilieu und pH-Wert im RRA-Medium (siehe Kap. 3.3.4.) als Standardmedium für die Bindungsassays eingesetzt.

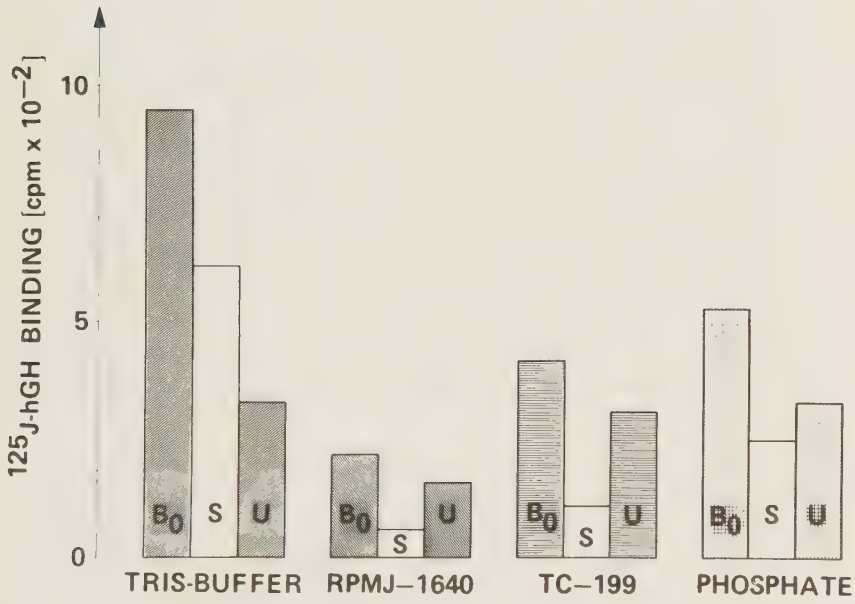


Abb. 1 BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN LYMPHOZYTEN IN VERSCHIEDENEN INKUBATIONSMEDIEN. Histogramme von Total Binding (B_O), spezifischem (S) und unspezifischem (U) Bindungsanteil. Mittelwerte von sechs unabhängigen Dreifachbestimmungen. Ordinate: Bindung von ^{125}J-hGH in Prozent der eingesetzten Radioaktivität. Beschreibung der Medien, siehe Kap. Methodik.

2.2. Zellzahlabhängigkeit

Charakteristisch für die Bindung eines Liganden an einen definierten Rezeptor mit endlicher Bindungskapazität ist ein linearer Zusammenhang zwischen Rezeptorkonzentration und im Assay zu messender Bindung. Bei der Verwendung von Zellen als Rezeptor-tragendem System können Zellaggregationen durch die Maskierung von Bindungsstellen diesen Zusammenhang erheblich stören (196). Hochaffine Rezeptorsysteme sollten, um diesen Effekt zu vermeiden, möglichst in niedriger Konzentration verwendet werden (197). Die ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphozyten in Abhängigkeit von der Zahl der im Assay eingesetzten Zellen wurde getestet, um optimale Zellkonzentrationen für hGH-RRAs mit Lymphozyten zu finden.

Bei zunehmender Zellkonzentration war eine zunehmende Aggregation der Zellen mikroskopisch zu beobachten. Mit zunehmender Zellaggregation nahm die Hormonbindung in Relation zur Zellzahl ab. Unter Zusatz von DNAse (0.1 ng/ml) traten keine Aggregationen auf (Aggregatbildung durch aus geschädigten Zellen austretende DNA wird verhindert), und die Bindung von ^{125}J-hGH verhielt sich proportional zur Zellzahl (Abb. 2). Aggregatbildung zwischen DNAse und ^{125}J-hGH trat nicht auf oder beeinflußte zumindest die Zellbindungswerte nicht, da in mitgeführten Kontrollen mit DNAse und Tracer ohne Zellen keine "Bindung" gemessen wurde. In niedrigen Zellkonzentrationen, bei denen keine Zellaggregation auftrat, waren die Bindungsergebnisse mit und ohne DNAse nahezu identisch.

Entsprechend den Ergebnissen dieser Versuche wurden in den Standardassays niedrige Zellkonzentrationen ($1x10^6$ Zellen/ml/Ansatz) ohne DNAse-Zusatz eingesetzt.

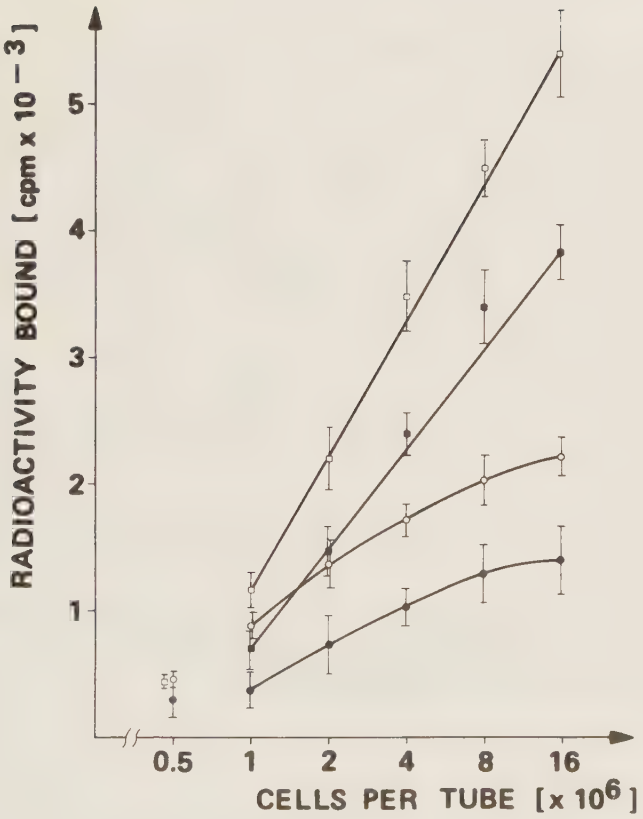


Abb. 2 BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN LYMPHOZYTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZELLKONZENTRATION IM ASSAY. Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von acht unabhängigen Doppelbestimmungen. Abszisse: Zellzahl pro Ansatz. Ordinate: Bindung von ^{125}J-hGH in [cpm x 10^{-3}]. □ und ■ DNAse-Zusatz (0.1 ng/ml) im Assaypuffer. ■ und ● Zusatz von 25 ng nicht radioaktiv markiertem hGH.

2.3. Lebendigkeit der Zellen

Es ist gelungen, Rezeptorproteine in Lösung zu bringen und RRAs mit solchen Rezeptor-Lösungen aus isolierten Rezeptorproteinen aufzubauen (54, 106, 108, 135, 145, 188). Methodische Schritte in der Isolation von Rezeptormolekülen sind Ultrazentrifugation und Aufschließen von Gewebe durch Tiefgefrierung (56). Die Möglichkeit von einer Isolation des Lymphozytenrezeptormoleküls für hGH und die Bedeutung der Zellintegrität für die Bindung von hGH an menschlichen Lymphozyten wurden deshalb untersucht.

An durch Tiefgefrieren oder Ultrazentrifugation abgetöteten Zellen wurde keine spezifische Bindung für hGH gemessen (Tab. 7). Aktive, an die Zellintegrität gebundene Zellprozesse scheinen somit für die hGH-Bindung verantwortlich zu sein. Grobe morphologische Methoden sind zur Determinierung der Bindungsfähigkeit ausreichend (Zellform, Trypanblauanfärbbarkeit).

In den Standardassays wurden nur lebende Zellen eingesetzt. Ausschluß der Trypanblauanfärbbarkeit galt als ausreichendes Kriterium für die Lebendigkeit.

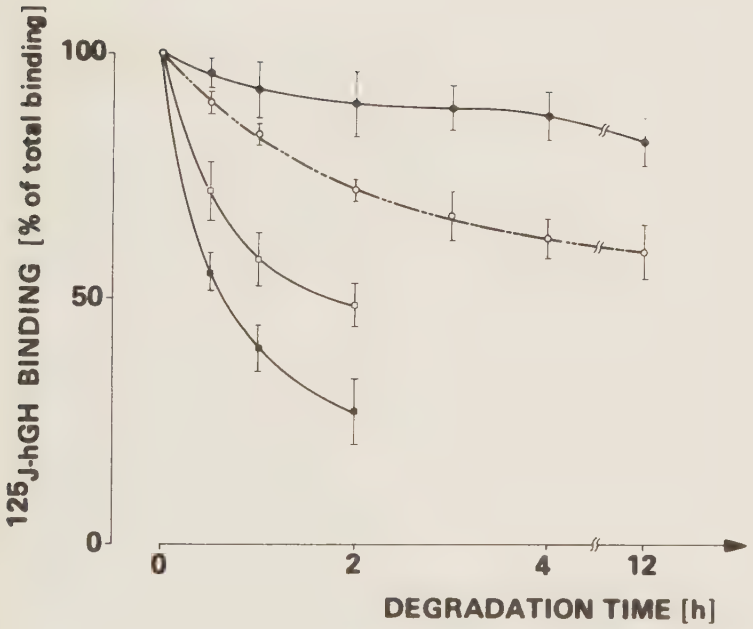


Abb. 3 DISSOZIATION VON GEBUNDENEM ^{125}J-hGH IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT. Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Dreifachbestimmungen Abszisse: Zeit nach Standardbindungsassay in [h]. Ordinate: Bindung von ^{125}J-hGH in Prozent der maximalen Bindung im Standardassay. ○ bei 37°C in Assaypuffer, ● bei 4°C in Assaypuffer, □ bei 37°C in Assaypuffer mit 3 M NaCl/l, ■ bei 37°C in Assaypuffer mit 6 M NaCl/l.

2.4. Tracer

2.4.1. Traceralter

Hormonpräparationen, die ihre biologische Aktivität verloren haben, weisen nur geringe Rezeptorbindung auf (107). Unterschiedliche Aufbewahrungsmethoden und unterschiedliche Aufbewahrungsdauer radioaktiv markierter Hormone führen entsprechend zu unterschiedlichen Ergebnissen in RRAs (137). Bindungscharakteristika von frisch markiertem hGH und von verschieden lang (tiefgefroren) aufbewahrtem Tracer wurden untersucht.

Assoziationskonstanten und MBK frisch markierter Tracerpräparationen waren gegenüber den entsprechenden Parametern tiefgefrorener, längere Zeit gelagerter Tracer konstant höher. Deutlich erniedrigte Bindungswerte (Total Binding = Gesamtbindung) wurden allerdings erst bei Verwendung von ^{125}J-hGH, das länger als vier Wochen gelagert war, beobachtet (Tab. 8.I.).

Auf Grund dieser Befunde wurden in den Standardassays frisch markierte Tracerpräparationen verwendet.

2.4.2. Big-hGH

Die Rezeptoraktivität von hGH-Präparationen soll von ihrem Gehalt an Big-Hormon, bzw. der Relation von Big- zu Little-Hormon in diesen Präparationen abhängig sein (130). Big-hGH scheint an Lymphoblasten und an Leberplasmamembranen mit geringerer Affinität (127, 128, 247) bzw. mit geringerer Spezifität (217) zu binden als Little-hGH. Darüber hinaus wird vermutet, daß an Kaninchen-Lebermembranen sowohl ein Rezeptor für Little-GH als auch ein spezifisch Big-GH bindender Rezeptor vorhanden ist (124, 285, 286). Da die

verschiedenen Formen des hGH in vitro (d.h. auch unter Lagerbedingungen von Tracerpräparationen) ineinander konvertieren (26, 29, 124, 128, 288), wurden verschiedene hGH-Fraktionen aus den Rechromatographie-Peaks der Hormonmarkierung (311) ohne Lagerung direkt nach der Jodinierung auf ihre Bindungsfähigkeit an Lymphozyten untersucht.

Die Gesamtbindung von Big-hGH-Präparationen war geringfügig höher als die von Little-Hormon (Tab. 9). Allerdings wurden bis zu 30% dieser 'Big-Bindung' durch Little-hGH verdrängt (Tab. 8.II.). Diese Verdrängbarkeit nahm mit zunehmendem Traceralter zu. Big-hGH scheint somit tatsächlich unter Lagerungsbedingungen (- 8°C) in Little-hGH umgewandelt zu werden. Little-Hormon besaß weit höhere Affinität und Spezifität zum Rezeptor (Tab. 9) als Big-Hormon, dessen Bindung an Lymphozyten zu einem beträchtlichen Teil auf den Little-hGH-Gehalt dieser Big-Präparationen zurückzuführen war. Ob Big- und Little-hGH am selben Rezeptor binden, bzw. ob Big-Hormon spezifische Rezeptoren an Lymphozyten des Menschen besitzt, kann nur durch Verdrängungsstudien mit unmarkiertem Big-Hormon weiter untersucht werden.

Aus den vorliegenden Befunden ging hervor, daß sorgfältig chromatographierte Little-hGH-Präparationen als Assaytracer wichtige Voraussetzung für exakte Bindungsstudien an Lymphozyten sind. Kontamination der Little-^{125}J-hGH-Präparationen für die Standardassays durch Big-Hormon wurde deshalb durch Verwendung frisch markierter Little-Fraktionen ausgeschlossen (siehe Kap. 2.4.1.).

2.4.3. Tracerreinigung

Die Heterogenität des zirkulierenden Wachstumshormons ist bekannt (226, 285). Die Rolle der verschiedenen hGH-Formen aber bleibt bis heute ungeklärt (27). Verschiedene hGH-Formen weisen unterschiedliche Bindungscharakteristika an verschiedenen Geweben auf (127, 128, 217, 247). Es ist denkbar, daß verschiedene GH-Formen unterschiedliche Rezeptoraffinität in verschiedenen Geweben besitzen. Es wurde deshalb untersucht, ob weitere Reinigung von Little-^{125}J-hGH höhere Bindungsaktivität an Lymphozyten zum Ergebnis hat.

An Lymphozyten gebundenes ^{125}J-hGH, in einem zweiten Versuchsansatz: an Leberplasmamembranen des Kaninchens gebundener Little-Tracer wurde durch hochmolare Salzlösung (3 M NaCl) vom Rezeptor abgelöst und rechromatographiert (Abb. 5). Das Rechromatographieprofil zeigte einen beträchtlichen Anteil an Big-Hormon, obwohl nur die Little-Fraktion der Hormonmarkierung eingesetzt worden war. Konversion von Little-Hormon zu Big-Hormon ist damit belegt. Verschiedene Rechromatographie-Fraktionen des über Rezeptorbindung gereinigten Tracers wurden auf ihre Bindungsfähigkeit an Lymphozyten untersucht (Abb. 4).

Das über Lymphozytenbindung gereinigte Little-hGH wies zweifach höhere Affinität zum Rezeptor (K_a = 2.8 x 10^9 M^{-1} gegenüber 1.4 x 10^9 M^{-1}) und doppelt so hohen spezifischen Anteil an der Bindung (11.2% gegenüber 5.4%) als unbehandelter frisch markierter Little-Tracer auf. (Die Ausbeute an 'gereinigtem' Big-Hormon war zu gering für Bindungsstudien). Die über Plasmamembranen (siehe Kap. 9.1.2.4.) gereinigten hGH-Fraktionen zeigten dagegen im Lymphozyten-RRA erniedrigte Bindungswerte (K_a = 0.8 x 10^9 M^{-1}, spezifische Bindung 4.1%) (Abb. 6).

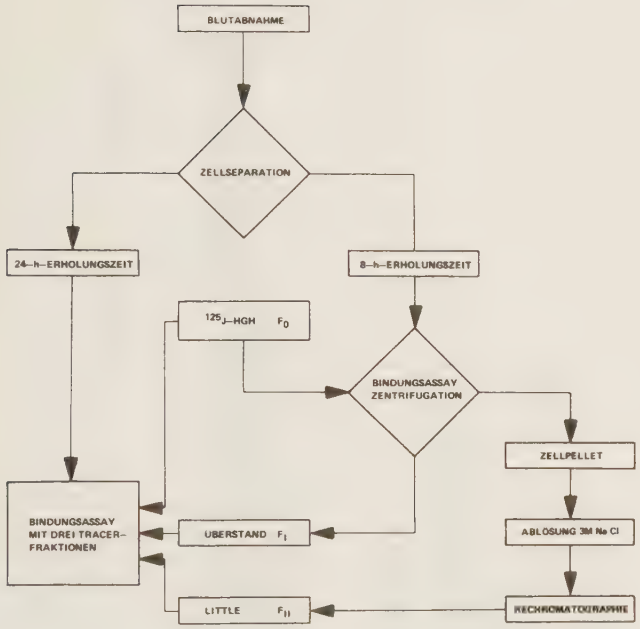


Abb. 4 REINIGUNG VON LITTLE-hGH-TRACER ÜBER LYMPHOZYTEN-REZEPTOREN - UNTERSUCHUNGSGANG -. Der an Lymphozyten gebundene Tracer wird mit hochmolarer Salzlösung (3 M NaCl) vom Rezeptor abgelöst, rechromatographiert und im RRA eingesetzt (F II). Als Kontrollen werden im RRA ungereinigter Tracer (F O), Tracer aus dem Überstand (F I) und über Kaninchenlebermembranen gereinigter Tracer eingesetzt (F III).

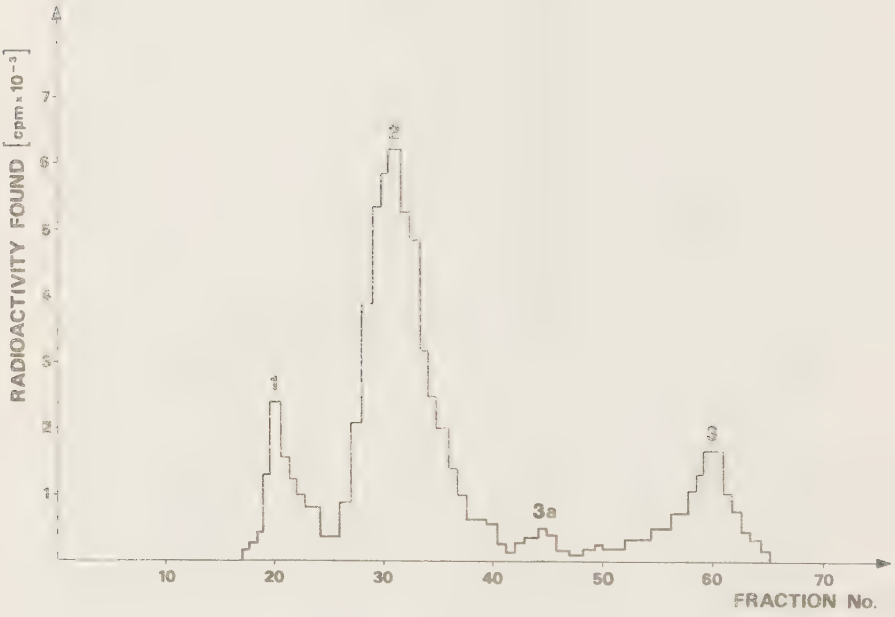


Abb. 5 RECHROMATOGRAPHIEPROFIL NACH REINIGUNG VON LITTLE-hGH-TRACER ÜBER LYMPHOZYTENREZEPTOREN.
Sephadex-G-75-Säule (Länge 50 cm, Ø 1.5 cm).
Abszisse: Fraktionsnummer (Fraktion zu 2 ml).
Ordinate: Radioaktivität in [cpm/0.5 ml].
1: Big-hGH-Fraktion, 2: Little-hGH-Fraktion,
3a: Proteinfragmente, 3: Salzpeak. Das Profil entspricht ungefähr den Rechromatographieprofilen nach Tracermarkierung.

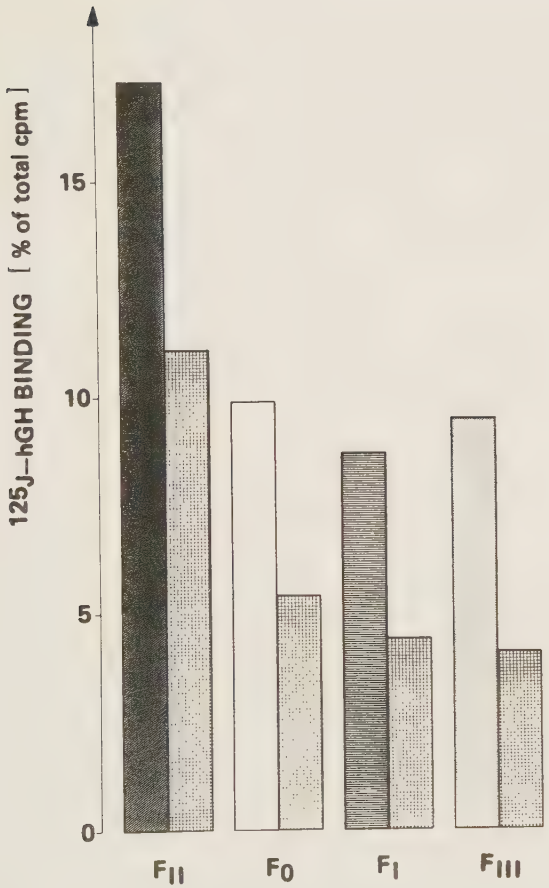


Abb. 6 BINDUNG VON GEREINIGTEM LITTLE-hGH-TRACER AN LYMPHOZYTEN. Mittelwerte von zwei unabhängigen Doppelbestimmungen. Ordinate: Bindung von ^{125}J-hGH in Prozent der eingesetzten Radioaktivität. Karierte Säulen: spezifischer Bindungsanteil. F_O: unbehandelter Tracer, F_I: Tracer aus dem Überstand der Reinigungsbindung, F_{II}: über Lymphozytenrezeptoren gereinigter Tracer, F_{III}: über Lebermembranen gereinigter Tracer.

Es ist möglich, daß Veränderungen am Tracer während unterschiedlicher Ligand-Rezeptor-Interaktion die beschriebenen Unterschiede in der Bindungsaktivität von verschiedenen vorbehandelten Tracerfraktionen bewirken. Ebenso möglich ist es aber, daß auch bisher als homogen angesehene Hormonformen wie sorgfältig chromatographiertes Little-hGH ein heterogenes Gemisch von Hormonformen mit unterschiedlichen Eigenschaften (z.B.: unterschiedlicher Rezeptoraffinität) und unterscheidbaren Funktionen im Organismus oder spezifischen Organen darstellen. Für die Standardassays war es auf Grund des hohen methodischen Aufwands nicht möglich, routinemäßig solche Reinigungsschritte an die Hormonmarkierung (siehe Kap. 9.1.2.2.) anzuschließen.

2.4.4. LPO-, Chloramine-T-Markierung

Sorgfältige Hormonmarkierungsmethoden sind Voraussetzung für den Aufbau von RRAs (18, 140, 156). Bisher in der Literatur beschriebene Untersuchungen über die Bindung von hGH an menschlichen Lymphozyten verwendeten über die Chloramine-T-Methode markiertes ^{125}J-hGH (98, 117, 148). Es sollte deshalb geklärt werden, ob sich über das LPO-Verfahren markiertes hGH hinsichtlich seiner Bindung an Lymphozyten von über die Chloramine-T-Methode gekennzeichneten Hormon unterscheidet.

Hinsichtlich der Bindung an peripheren Lymphozyten des Menschen unterschieden sich die nach beiden Markierungsverfahren jodinierten Tracer nicht (Tab. 10). Die in zwei verschiedenen Laboratorien markierten frischen ^{125}J-hGH-Präparationen (Kap. 9.1.2.2.) erwiesen sich hinsichtlich Affinität und Spezifität der Lymphozytenbindung als identisch.

Auf Grund der in der Literatur beschriebenen geringeren Veränderung immunologischer Eigenschaften des Hormon-

moleküls mit der LPO-Markierung (Tab. 10) wurde in den Standardassays LPO-markiertes ^{125}J-hGH benutzt. Die Bindungsergebnisse mit diesem Tracer können aber auf Grund des hier gezeigten Vergleichs mit in der Literatur beschriebenen Befunden mit Chloramine-T markiertem Hormon verglichen werden.

2.5. Hormondissoziation

Abdissoziation von gebundenem Hormon und Rezeptorverlust mit Freiwerden von gebundenem radioaktivem Hormon sind Vorgänge, die in RRAs mit Verdrängungskurven interferieren können (77, 131). Der Abfall gebundener Radioaktivität im Lymphozytenpellet in Abhängigkeit von der Zeit nach durchgeführtem Bindungsassay wurde deshalb gemessen.

Maximale Dissoziation war bei 37°C mit 40% Bindungsabfall vier Stunden nach dem RRA erreicht. Bei niedrigerer Temperatur war die gemessene Dissoziation deutlich geringer, Zusatz von hochmolaren Salzlösungen zum Medium nach dem Bindungsassay dagegen beschleunigte und erhöhte die Abdissoziation von ^{125}J-hGH bis auf 75% zwei Stunden nach dem RRA (Abb. 3).

Die Hormondissoziation vom Lymphozytenrezeptor ist demgemäß zeit- und temperaturabhängig. Bei den im Standardassay gewählten kurzen Inkubationszeiten (120 Min.) kann die Abdissoziation von bereits gebundenem GH allgemein als sehr gering angesehen werden. Die Wahl kurzer Inkubationszeiten für RRAs ist zu empfehlen. Zugabe von kaltem (4°C) Assaypuffer nach der Inkubationszeit verhindert die Dissoziation nahezu vollständig (Kap. 9.1.2.3.).

2.6. Re-Expression

Zelluläre Steroidrezeptoren können durch die Zellseparation an sich und durch mechanische Manipulationen an den Zellen supprimiert werden (211). GH- und Insulin-sensitive Adipozyten können während der Zellseparation die Fähigkeit, diese Hormone spezifisch zu binden, verlieren (89), exprimieren diese Bindungsfähigkeit aber nach einem zeitlichen Intervall zwischen Zellseparation und RRA (92). Es sollte deshalb geklärt werden, ob Lymphozytenrezeptoren für hGH in Abhängigkeit von der Zeit zwischen Zellseparation und Rezeptorassay Veränderungen erfahren, bzw. ob die zytotoxischen Zellseparationsmedien die Proteohormonbindung an Zelloberflächen verringern können.

Überraschenderweise banden nur ein Prozent der eingesetzten Traceraktivität spezifisch an Lymphozyten, wenn der RRA direkt im Anschluß an die Zellseparation durchgeführt wurde. Nach vier Stunden 'Ruhezeit' bei 20°C (100×10^6 Zellen in 50 ml Tris-Assaypuffer) versechsfachte sich dieser Wert (Tab. 11). Hiernach war ein Plateau erreicht, das erst nach 24 h abfiel (Abb. 8). Dieser Abfall ist möglicherweise auf die Absterberate der Lymphozyten zurückzuführen, da nach 24 h ca. 10% der Lymphozyten (bei 20°C in Tris-Assaypuffer) abgestorben sind (Abb. 7). 'Ruhezeiten' bei 4°C und 37°C zeigten einen anderen Verlauf der hGH-Bindung: Das Re-Expressionsphänomen ist damit als temperaturabhängig anzusehen (Abb. 7). Scatchard Plots zeigten, daß die beobachtete Bindungszunahme auf Zunahme der Affinität der Zellen beruhte. Die Affinitätszunahme war dabei so ausgeprägt, daß ein parallel zum Anstieg der K_a verlaufender Abfall der MBK weit mehr als kompensiert wurde (Tab. 11).

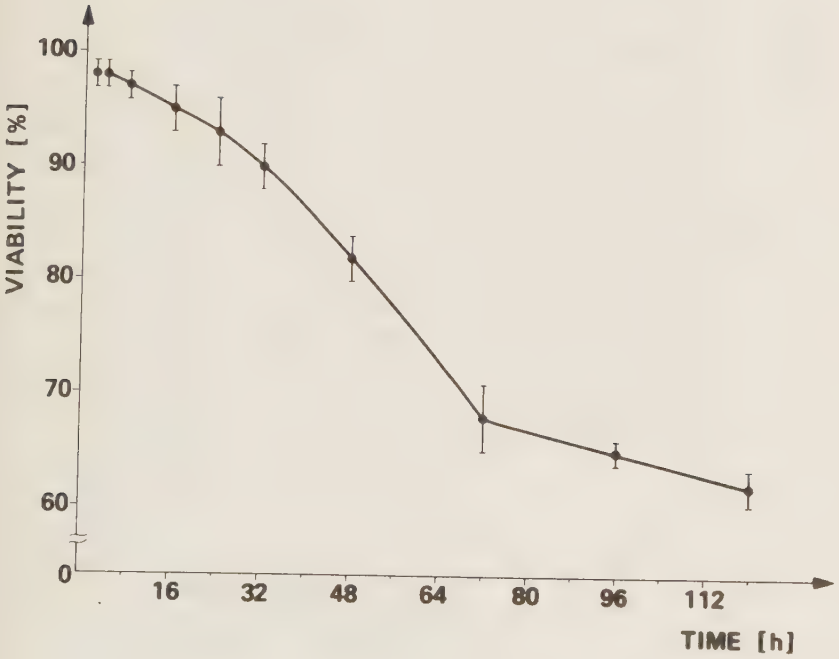


Abb. 7 ABSTERBEKURVE VON LYMPHOZYTEN NACH DER ZELL-SEPARATION. Mittelwerte und Standardabweichungen von zehn unabhängigen Dreifachzählungen im Lichtmikroskop. Abszisse: Zeit nach Zellseparation, 20°C in Assaypuffer. Ordinate: Zellebendigkeit ausgedrückt als Trypanblau-Negativität in Prozent.

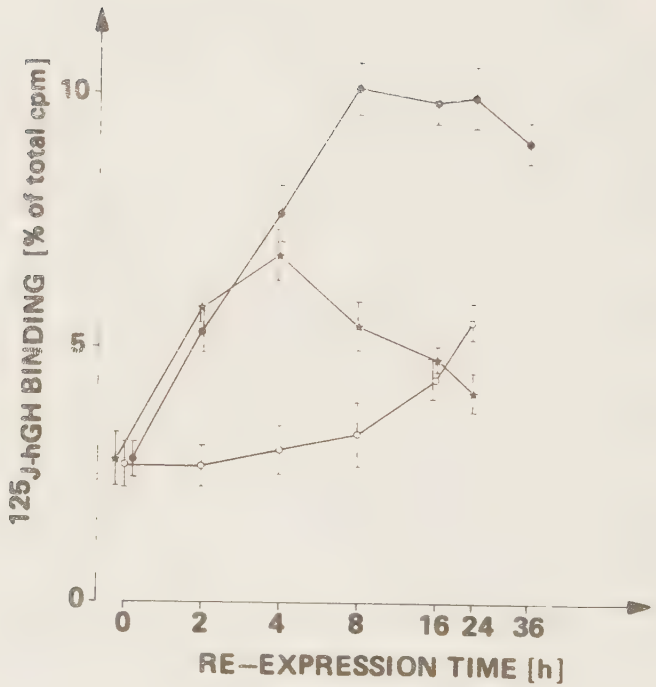


Abb. 8 REZEPTOR-RE-EXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZEIT-INTERVALL ZWISCHEN ZELLSEPARATION UND RRA.
Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von fünf Vierfachbestimmungen. Abszisse: Zeit zwischen Zellseparation und RRA in [h]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der eingesetzten Radioaktivität. ● Intervall bei 20°C, ○ Intervall bei 4°C, ✳ Intervall bei 37°C.

Das beschriebene Phänomen der Re-Expression vermag zu erklären, warum manche Arbeitsgruppen in der Lage waren, hGH-Bindung an peripheren menschlichen Zellen nachzuweisen, andere Autoren aber nicht. Durch aggressive, zytotoxische Zellseparationsverfahren mag es zur Störung der Zellintegrität, zumindest aber zur Störung der Zellfunktion kommen. Re-Expressionsphasen könnten es den Zellen ermöglichen, wieder intakte Zellmembranen und intakte Membranfunktionen herzustellen. Die beschriebene Vorinkubation der Zellen in Assaypuffer könnte andererseits eine in vivo maskierte Bindungsfähigkeit der Zellen für hGH freilegen. Veränderungen an der Zellmembran oder gar Blastentransformation der Zellen (siehe Kap. 4.6.1. und Kap. 4.6.2.) im Assaypuffer könnten hierfür verantwortlich sein. Für die Standardassays wurden auf Grund dieser Ergebnisse nur Zellen verwendet, die zwischen acht und 16 Stunden Re-Expressionszeit zwischen Zellseparation und RRA durchlaufen hatten.

3. Rezeptorcharakterisierung

3.1. Theorie

Folgende Merkmale werden Proteohormonrezeptoren definitionsgemäß zugewiesen (77, 169, 266):

1. Die Hormonbindung am Rezeptor ist sättigbar.
2. Die Bindung ist reversibel, d.h. per se verdrängbar.
3. Die Hormon-Rezeptor-Interaktion löst am Rezeptortragenden System einen biologischen Effekt aus. Rezeptor und biologischer Effekt sind gewebsspezifisch.
4. Die Bindung eines Hormons ist spezifisch, d.h. läßt sich kompetitiv nur durch identisches Hormon verdrängen.
5. Der Rezeptor besitzt hohe Affinität, die für physiologische Hormonkonzentrationen in vivo relevant ist.
6. Temperaturkinetik, Abhängigkeit der Bindung vom Ionenmilieu und mathematische Größen wie Assoziationskonstanten und maximale Bindungskapazität charakterisieren den Rezeptor.

Die Beschreibung eines Rezeptors verlangt die Darstellung der oben genannten Parameter. Im Falle des Lymphozytenrezeptors muß außerdem auf die Identität der bindenden Zelle, d.h. auf mögliche Hormonbindung an in Lymphozytenpopulationen mehr oder weniger vorhandenen anderen Zellen (Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten) eingegangen werden.

3.2. Tracersättigung

Bei konstanter Rezeptorkonzentration nimmt die Bindung des Liganden mit steigender Konzentration solange zu, bis alle vorhandenen Bindungsstellen besetzt sind: Das Rezeptorsystem gilt dann als gesättigt (169). Die Sättigbarkeit des Lymphozytenrezeptors wurde entsprechend getestet.

Eine Million Lymphozyten wurden im RRA mit steigenden Konzentrationen von ^{125}J-hGH (1 ng - 250 ng radioaktives Hormon/tube) inkubiert. Sättigung wurde mit ca. 25 ng ^{125}J-hGH erreicht (Abb. 9). Die gebundene Radioaktivität betrug bei Sättigung 3000 - 3300 cpm, was einer spezifischen Bindung von vier bis sieben Prozent entspricht.

3.3.1. Temperaturabhängigkeit

Hohe Inkubationstemperaturen können in Rezeptorsystemen zu Bindungsverlust durch Hormondegradation führen (301). Niedrige Inkubationstemperaturen ergeben auf der anderen Seite verminderte maximale Bindungswerte (159, 161, 221, 239, 266). Dem Vorteil hoher maximaler Hormonbindung bei 37°C (134, 149, 169, 181, 204, 206) steht der Nachteil höherer Hormondissoziation (199) und höherem unspezifischen Bindungsanteil (135) bei Körpertemperatur gegenüber. Bindungscharakteristika von hGH an Lymphozyten bei 120 Min. Inkubation bei verschiedenen Temperaturen (nach 120 Min. kann ein Gleichgewicht zwischen Hormonbindung und Hormondegradation angenommen werden (siehe Kap. 2.5. und 3.3.2)) wurden untersucht.

Maximale Affinität (K_a) und Spezifität wurden bei 37°C erzielt.

Die gemessenen Bindungswerte (B_o) lagen bei 37°C um ca. 40% höher als bei 30°C (Tab. 12).

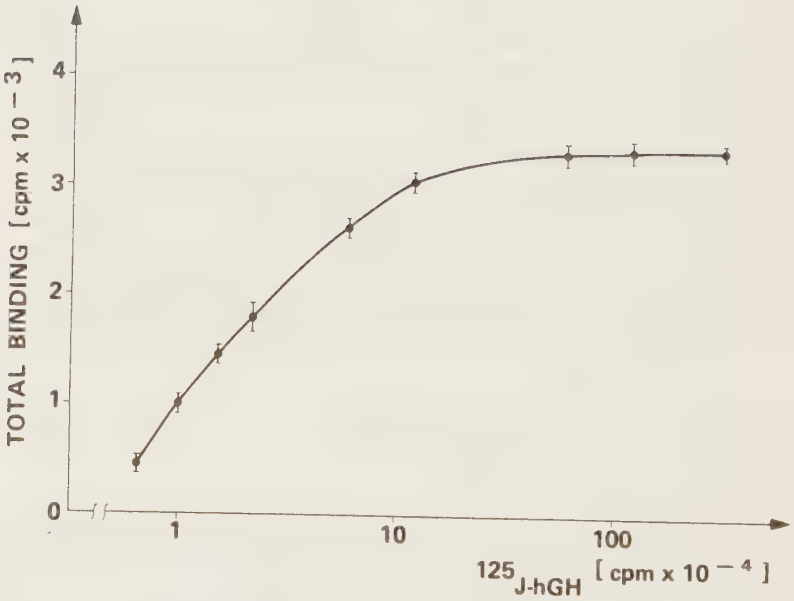


Abb. 9 SÄTTIGUNGSKURVE DES hGH-REZEPTORS AN LYMPHOZYTEN. Halblogarith mische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von acht unabhängigen Doppelbestimmungen. Abszisse: Tracerkonzentration in [cpm/tube] . Ordinate: Total Binding (B_O) in [cpm] .

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde im Standardassay die physiologische Körpertemperatur als Inkubationstemperatur bei einer Inkubationsdauer von 120 Min. gewählt.

3.3.2. Zeit- und Temperaturkinetik

Mit der Inkubationsdauer ändern sich Bindungsparameter von GFs an Rezeptor tragenden Zellen (260). Internalisation des Hormonrezeptorkomplexes (132), Hormondissoziation (199), Rezeptorzahl pro Zelle (206) und unspezifischer Bindungsanteil (68) ändern sich mit der Inkubationsdauer und führen so zu einer charakteristischen Bindungskinetik eines Hormons. Die Bindungskinetik von hGH an Lymphozyten des Menschen wurde bei vier verschiedenen Inkubationstemperaturen gemessen.

Maximale Bindungswerte wurden bei 37°C nach zwei Stunden Inkubation erreicht. Anschließend war ein Plateau mit unwesentlich niedrigeren Bindungswerten zu beobachten. Der spezifische Bindungsanteil (verdrängbarer Anteil) schien den typischen Verlauf der Bindung zu verursachen (Abb. 10). Bei niedrigerer Temperatur sind die erreichten Bindungswerte um mehr als die Hälfte niedriger als bei 37°C, das Bindungsmaximum wird außerdem später erreicht (Abb. 10). Höhere Inkubationstemperaturen führen ebenfalls zu geringeren Bindungswerten, verursachen außerdem einen relativ steilen Bindungsabfall ohne deutlich zu erkennende Plateaubildung.

Da bei 120 Min. Inkubationszeit bei einer Inkubationstemperatur von 37°C die Hormondissoziation vernachläßigt werden kann (Kap. 2.5.) und auf Grund der Plateaubildung in der Zeitkinetik mit 37°C ein Gleichgewichtszustand für die Bindung unter diesen Bedingungen angenommen werden kann, wurde der Standardassay bei 37°C und 120 Min. Inkubationsdauer durchgeführt.

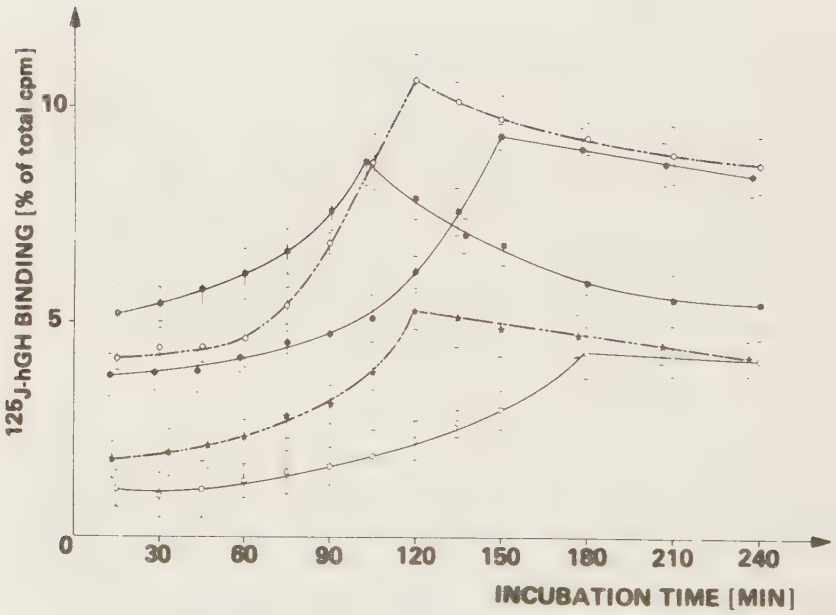


Abb. 10 BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN LYMPHOZYTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSTEMPERATUR UND DER INKUBATIONSDAUER. Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Dreifachbestimmungen. Abszisse: Inkubationsdauer in [Min.]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der eingesetzten Radioaktivität.
○ : B_0 bei 37°C, ✳ : Bindung bei Zusatz von 25 ng hGH bei 37°C, □ : B_0 bei 4°C, ● : B_0 bei 20°C, ■ : B_0 bei 40°C.

3.4. Ionenabhängigkeit

Fluktuationen des Membranpotentials (269) werden für Änderungen der hGH-Bindung an menschlichen Lymphozyten und Lymphoblasten verantwortlich gemacht (148). Wenn sich auch die Befunde zum Einfluß einzelner Ionen auf die Hormonbindung an Zielgeweben in der Literatur widersprechen, so gilt doch als gesichert, daß jede Proteohormonrezeptorinteraktion vom Ionenmilieu des Inkubationsmediums in vitro abhängig ist (77, 91, 266). Die Rolle ein- und zweiwertiger Kationen sowie die Rolle des pH-Werts im Inkubationsmedium in der Interaktion zwischen hGH und der Lymphozytenmembran wurde getestet.

3.4.1. Zweiwertige Kationen

Hohe Calcium-Konzentrationen verhindern die ACTH-Bindung an der Nebenniere (195), erhöhen die Bindung von Insulin an menschlichen Plazentarzellen (239), aber haben keinen Einfluß auf die Bindung von ^{125}J-Insulin an peripheren menschlichen Lymphozyten (129).

Am Lymphozytenrezeptor für hGH führte der Zusatz von $CaCl_2$ zum Inkubationsmedium sowohl zu einem Abfall des B_o als auch zu einem Rückgang des spezifischen Bindungsanteils: B_o bei einer Calcium-Konzentration von 24 mmol/l nur noch 40% des Ausgangswertes, spezifische Bindung bei einer Calciumkonzentration von 24 mmol/l nur 70% des Ausgangswertes ohne Calcium. Dabei zeigten sich K_a und MBK gleichermaßen reduziert: K_a ohne Calcium 2.0×10^9 M^{-1} gegenüber 1.0×10^9 M^{-1} bei 24 mmol/l Calcium, MBK ohne Calcium 5.3×10^{-11} M/10^6 Zellen gegenüber 3.8×10^{-11} M/10^6 Zellen bei 24 mmol/l Calcium. Die Verdrängungskurven der hGH-Bindung verlaufen dementsprechend bei Zusatz von Calcium flacher und von niedrigeren B_o-Werten ausgehend (Abb. 11).

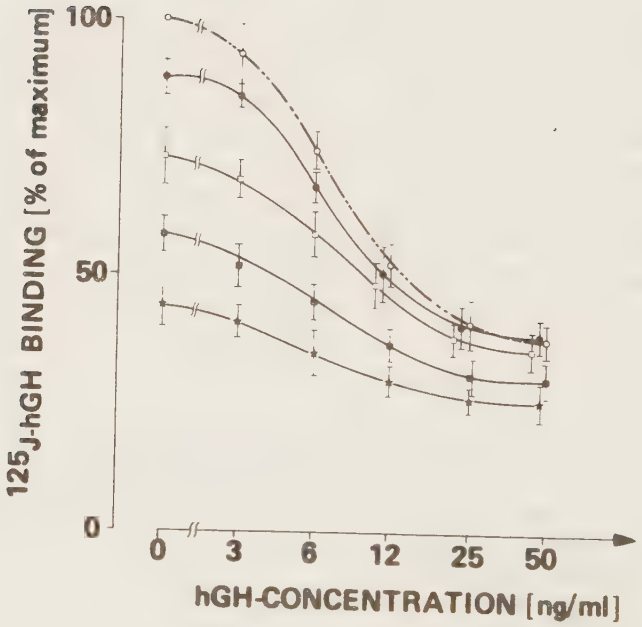


Abb. 11 VERDRÄNGUNGSKURVEN VON GEBUNDENEM ^{125}J-hGH IN ABHÄNGIGKEIT VON DER CALCIUM-KONZENTRATION DES INKUBATIONSMEDIUMS. Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von drei unabhängigen Doppelbestimmungen. Abszisse: Nicht radioaktiv markiertes hGH in [ng/ml]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der maximalen Bindung der Standardkurve. ○: Standardkurve ohne Calcium. ●: 3 mmol/l Calcium-Zusatz, □: 6 mmol/l Calcium-Zusatz, ■: 12 mmol/l Calcium-Zusatz, ✳: 24 mmol/l Calcium-Zusatz.

Magnesium-Ionen scheinen bei der Bindung von hGH und Insulin an menschlichem Lebergewebe eine große Rolle zu spielen (56). An Schilddrüsenmembranen ist die Bindung von TSH unter anderem Magnesium-abhängig (216).

An Lymphozytenrezeptoren für hGH scheint Magnesium starken Einfluß auf die Spezifität der Hormonbindung zu haben: Mit niedrigen Konzentrationen (1.2 mmol/l Magnesiumchlorid, der im Standardassay vorliegenden Konzentration) war die spezifische Bindung von ^{125}J-hGH um das Sechsfache gegenüber Werten bei dreifach höheren Magnesium-Konzentrationen (3.6 mmol/l) angehoben. Bei Unterschreiten von 1.2 mmol/l Magnesiumchlorid im Inkubationsmedium fiel der spezfische Bindungsanteil wieder ab. Die Bindungskapazität des hGH-Rezeptors stieg zwar mit zunehmender Magnesiumkonzentration des Mediums an, dieser Anstieg wurde aber durch den gleichzeitigen Abfall der Assoziationskonstanten bei Magnesiumkonzentrationen über 1.2 mmol/l überdeckt: K_a bei 1.2 mmol/l Magnesium 2.2×10^9 M^{-1}, bei 3.6 mmol/l Magnesium 0.3×10^9 M^{-1}, MBK bei 1.2 mmol/l Magnesium 4.4×10^{-11} M/10^6 bei 3.6 mmol/l Magnesium 14.2×10^{-11} M/10^6 Zellen. Den entsprechenden Verlauf der Verdrängungskurven für gebundenes ^{125}J-hGH bei verschiedenen Magnesium-Konzentrationen zeigt Abb. 12.

3.4.2. Einwertige Kationen

Die Natrium-Konzentration des Inkubationsmediums beeinflußt die Bindung von GH und Insulin an menschlicher Leber in vitro (56). Hohe Natrium-Konzentrationen (2 M/l) des Inkubationsmediums erhöhen die Insulin-Bindung an Fettzellmembranen auf das Sechsfache der Werte bei physiologischer Natrium-Konzentration (75). An Zellkulturen tierischer Hypophysen allerdings erhöhen hypotone Lösungen (mit niedrigen Natrium-Konzentrationen) die Bindung von Gonadotropin-Releasing-Hormon (204).

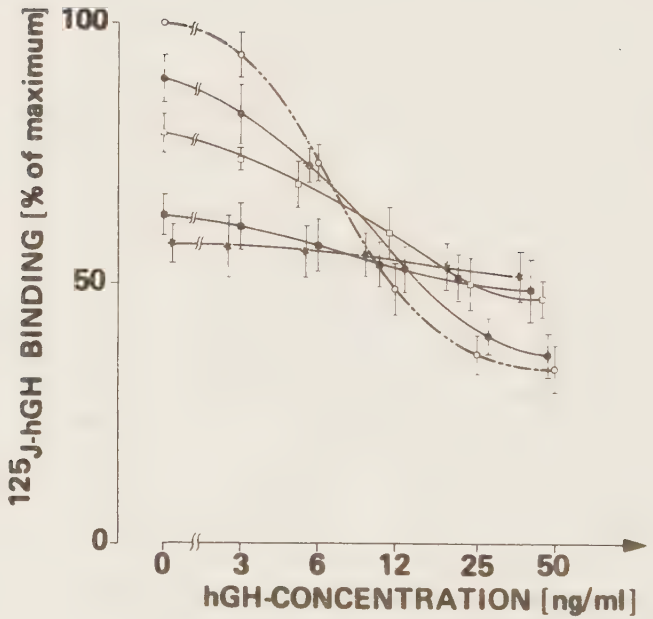


Abb. 12 VERDRÄNGUNGSKURVEN VON GEBUNDENEM ^{125}J-hGH IN ABHÄNGIGKEIT VON DER MAGNESIUM-KONZENTRATION DES INKUBATIONSMEDIUMS. Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von drei unabhängigen Doppelbestimmungen.
Abszisse: Nicht radioaktiv markiertes hGH in [ng/ml].
Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der maximalen Bindung der Standardkurve. ○ : Standardkurve, 1.2 mmol/l Magnesium, ● : 1.8 mmol/l Magnesium, □ : 2.4 mmol/l Magnesium, ■ : 3.0 mmol/l Magnesium, ✳ : 3.6 mmol/l Magnesium.

Veränderungen der Natrium-Konzentration wurden im hGH-RRA mit dem Abfall der spezifischen Bindung und niedriger Affinität des Lymphozytenrezeptors für hGH beantwortet: K_a bei 140 mmol/l Natrium im Medium $0.5 \times 10^9\ M^{-1}$ gegenüber $1.7 \times 10^9\ M^{-1}$ bei 120 mmol/l. Die Verdrängungskurven gebundenen Tracers unterschieden sich dementsprechend bei verschiedenen Natrium-Konzentrationen (Abb. 13). Osmotische Differenzen spielen in den untersuchten Ionenkonzentrationen sicher keine Rolle. Es ist somit anzunehmen, daß die Bindung von ^{125}J-hGH an Lymphozyten direkt von der Natrium-Konzentration im Assaypuffer abhängt. Physiologische Konzentrationen (im Standardassay mit 136 mmol/l bestehend aus 120 mmol/l NaCl und 16 mmol/l als Natriumacetat und EDTA-Komplex erreicht) scheinen zu maximalen Bindungswerten zu führen.

Kalium-Ionen sollen bei der Bindung verschiedener Hormone in verschiedenen Rezeptorsystemen eine Rolle spielen (118, 126, 196, 197, 216).

Die Bindung von ^{125}J-hGH blieb in drei unabhängigen Doppelbestimmungen mit menschlichen Lymphozyten bei fünf verschiedenen Kalium-Konzentrationen (1.25 - 10 mmol/l) unverändert. Die hGH-Bindung an Lymphozyten ist somit von der Kalium-Konzentration des Inkubationsmediums unabhängig.

3.4.3. pH-Abhängigkeit

Die Bindung von Insulin an Fibroblasten (236) sowie die Bindung von GH an Rattenfettzellen (120) ist pH-abhängig. In Lymphoblastenkulturen dagegen führen pH-Wert-Änderungen in einem weiten Bereich zu keinen Veränderungen der Insulin- oder GH-Bindung (129, 197). Es wurde deshalb untersucht, ob Änderungen des pH-Werts in vitro Veränderungen der hGH-Bindung an menschlichen Lymphozyten bewirken.

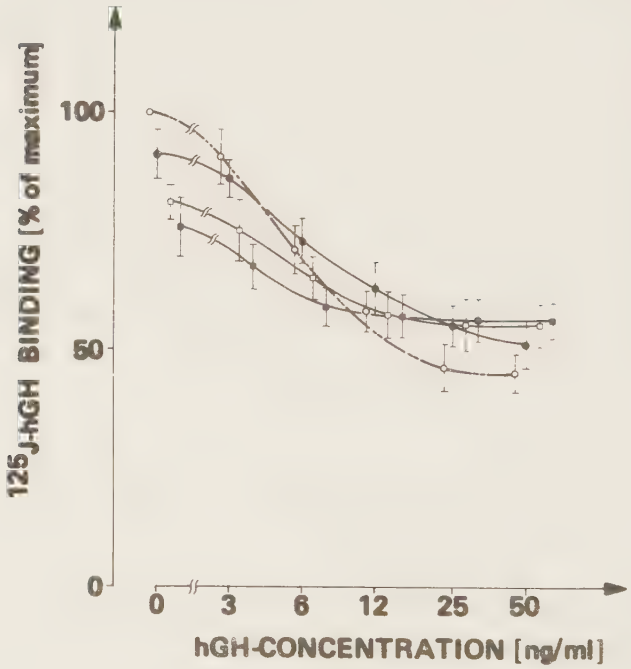


Abb. 13 VERDRÄNGUNGSKURVEN VON GEBUNDENEM ^{125}J-hGH IN ABHÄNGIGKEIT VON DER NATRIUM-KONZENTRATION DES INKUBATIONSMEDIUMS. Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von drei unabhängigen Doppelbestimmungen. Abszisse: Nicht radioaktiv markiertes hGH in [ng/ml]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der maximalen Bindung der Standardkurve. ○: Standardkurve mit 120 mmol/l NaCl, ●: 110 mmol/l NaCl, □: 130 mmol/l NaCl, ■: 140 mmol/l NaCl.

Im Bereich von pH 5 bis pH 8.5 blieb sowohl die hGH-Gesamtbindung als auch der spezifische Bindungsanteil vom pH-Wert unbeeinflußt: B_O 10.0 $\pm$ 0.8%, VK über alle pH-Bereiche 8%, Spezifische Bindung 6.1 $\pm$ 0.6%, VK über alle pH-Bereiche 10%, MBK 5.1 x 10^{-11} $\pm$ 0.3 x 10^{-11} M/10^6 Zellen (Ergebnisse von drei unabhängigen Doppelbestimmungen, pH-Werte: pH 5, pH 5.5, pH 6 etc.). In dem untersuchten pH-Bereich war nach zweistündiger Inkubation kein Abfall der Trypanblauanfärbbarkeit der Zellen (97 $\pm$ 2%) festzustellen.

Die Bindung von ^{125}J-hGH an lebenden menschlichen Lymphozyten ist somit als nicht vom pH-Wert des Inkubationsmediums abhängig anzusehen.

3.5. Reproduzierbarkeit und Präzision

Die Variabilitätskoeffizienten der B_O-Werte von Hormonbindungsstudien betragen zwischen 10 und 30%: an Rattenlebermembranen 20-30% (144), an Kaninchenlebermembranen 10-20% (303), an Rattenlebermembranen 15% (246), an Lymphoblasten 15% (264) und an menschlichen peripheren Lymphozyten 20% (7).

Um die Reproduzierbarkeit der GH-Bindungsergebnisse zu bestimmen, wurden Lymphozyten desselben Spenders (eines männlichen und eines weiblichen gesunden Probanden) an verschiedenen Tagen separiert und an verschiedenen Tagen auf ihre hGH-Bindungsfähigkeit untersucht. Der Variationskoeffizient der Gesamtbindung wurde wegen der damit möglichen Vergleichbarkeit mit Angaben aus der Literatur als mathematischer Parameter gewählt.

Bei beiden Versuchsreihen wurde eine hohe und eine niedrige Tracerkonzentration gewählt (Tab. 13). VKs für die Gesamtbindung betrugen 10 und 14%. Zwischen männlichem

Lymphozytenspender und weiblichem Probanden bestand kein Unterschied bezüglich der Reproduzierbarkeit. Die Variationskoeffizienten für die spezifische Bindung lagen je nach Serie zwischen sechs und 20% (Tab. 13). In allen Versuchen zeigten die hGH-Verdrängungskurven den charakteristischen Verlauf und nur geringe Standardabweichungen der einzelnen Messungen (Abb. 14).

Die Reproduzierbarkeit der ^{125}J-hGH-Bindungs- und Verdrängungswerte an Lymphozyten liegt damit in Bereichen, die mit Ergebnissen aus der Literatur vergleichbar sind, und die es erlauben, Interpersonalassays und damit klinische Untersuchungen mit dem in dieser Arbeit beschriebenen RRA für hGH durchzuführen.

Neben der Reproduzierbarkeit, die mittels Interassayvergleichs (s.o.) getestet wurde, wurde auch die Präzision der Bindungsstudien berechnet: In drei Assayserien wurden Sechsfach-Bestimmungen durchgeführt und für alle Bindungsparameter die Standardabweichung und die zugehörigen VKs bestimmt (Intraassayvergleich). In allen Darstellungen von Verdrängungskurven oder Bindungskinetiken wurde außerdem soweit mathematisch sinnvoll die Standardabweichung der einzelnen Meßpunkte eingezeichnet.

Die Variationskoeffizienten waren: für B_O 7.8%, für den spezifischen Bindungsanteil 14.2%, für die unspezifische Bindung 11.3%. Entsprechend variierten die Werte für die K_a um 11.4%, die Werte für die MBK um 14%.

Die in der vorliegenden Arbeit mittels eines Rezeptortragenden Zellsystems erreichten Variationskoeffizienten genügen selbst den Anforderungen für in klinischen Routinelabors durchgeführte enzymatische und radioimmunologische Untersuchungen. Für das Arbeiten mit lebenden Zellen sind in der Klinik höhere Abweichungen zu erwarten (24). Forschungslaboratorien, die mit Zellsystemen arbeiten, rechnen mit vergleichbaren Werten (36, 266, 295).

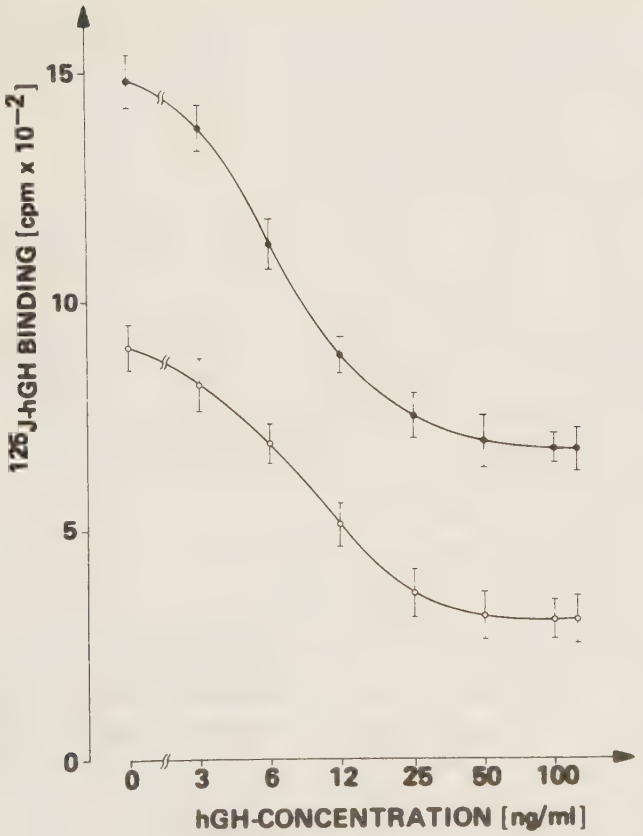


Abb. 14 VERDRÄNGUNGSKURVE VON GEBUNDENEM ^{125}J-hGH -STANDARD
Halblogarithmische Darstellung. Mittelwerte und Standardabweichungen. Abszisse: Nicht radioaktiv markiertes hGH in [ng/ml]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in [cpm x 10^{-2}]. ●: Gesunde, weibliche Versuchsperson, sechs unabhängige Doppelbestimmungen, ○ : gesunde, männliche Versuchsperson, 14 unabhängige Doppelbestimmungen.

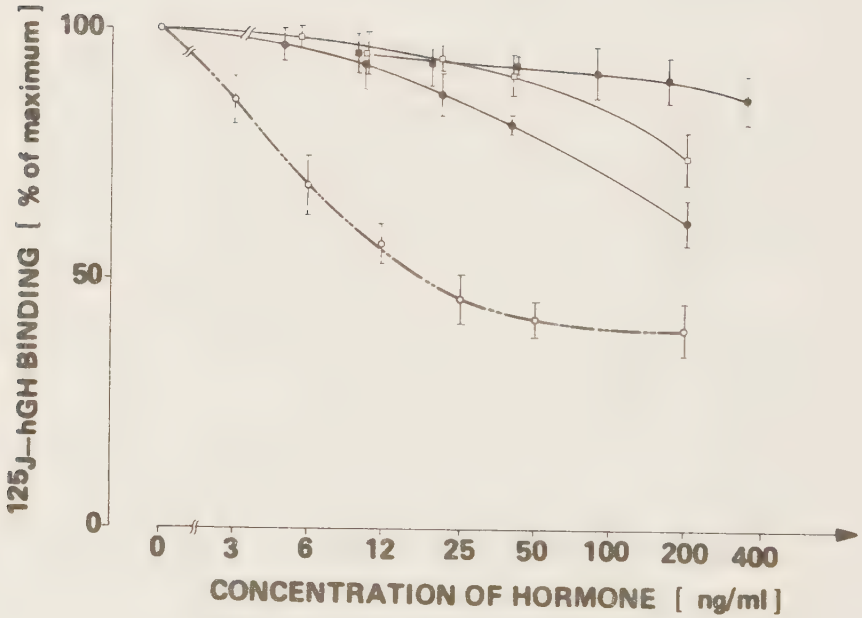


Abb. 15 VERDRÄNGUNGSKURVEN VON GEBUNDENEM ^{125}J-hGH-HYPOPHYSÄRE HORMONE. Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen. Abszisse: Hormonkonzentration in [ng/ml]. Ordinate: Bindung von ^{125}J-hGH in Prozent der maximalen Bindung der Standardkurve. ○: hGH, ●: PRL, □: LH-FSH, ■: TSH.

Der hier vorgestellte Nachweis von hGH-Rezeptoren an Lymphozyten des Menschen ist nach diesen Befunden reproduzierbar (nach der Interassayabweichung) und präzise (ermittelt durch die Intraassayabweichung).

3.6. Interferenzen

Unspezifische Serumproteine können in RRAs eine kompetitive Ligandverdrängung imitieren (135). Der Nachweis spezifischer Hormonbindung gilt deshalb erst dann als vollständig erbracht, wenn unspezifische Verdrängungseffekte ausgeschlossen oder als unwesentlich befunden worden sind (97, 153, 266). Zum Ausschluß unspezifischer Verdrängungsimitation wurden steigende Konzentrationen von BSA und Trypsin auf ihre Wirkung auf die ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphozyten untersucht.

Eine dosisabhängige Abnahme der ^{125}J-hGH-Bindung bei Anwesenheit von Trypsin bzw. BSA im Assaypuffer wurde beobachtet (Abb. 16). Die berechneten 'Bindungsparameter' (Scatchard Plots wurden unter der hypothetischen Annahme einer 'Ligand-Rezeptor-Interaktion' auf die Verdrängungsimitation durch beide Substanzen angewandt) lagen allerdings weit unter den die hGH-Rezeptor-Interaktion charakterisierenden Werten. Unspezifische Interferenzen sind, da die Anwesenheit anderer Proteine im Assaymedium ausgeschlossen ist, auf Grund dieser Ergebnisse somit für das hGH-Verdrängungsphänomen in keiner Weise verantwortlich. Allerdings ist es auf Grund der beschriebenen Interferenzen nicht möglich, den hier beschriebenen RRA für Serumbestimmungen von hGH anzuwenden. Die im Serum vorhandenen Trypsin- und Polypeptid-Konzentrationen markieren die spezifische Verdrängung von gebundenem ^{125}J-hGH: tatsächlich führte der Zusatz von 100 µl 1:100 verdünnten Humanserums pro Ansatz zum völligen Verschwinden der Bindung.

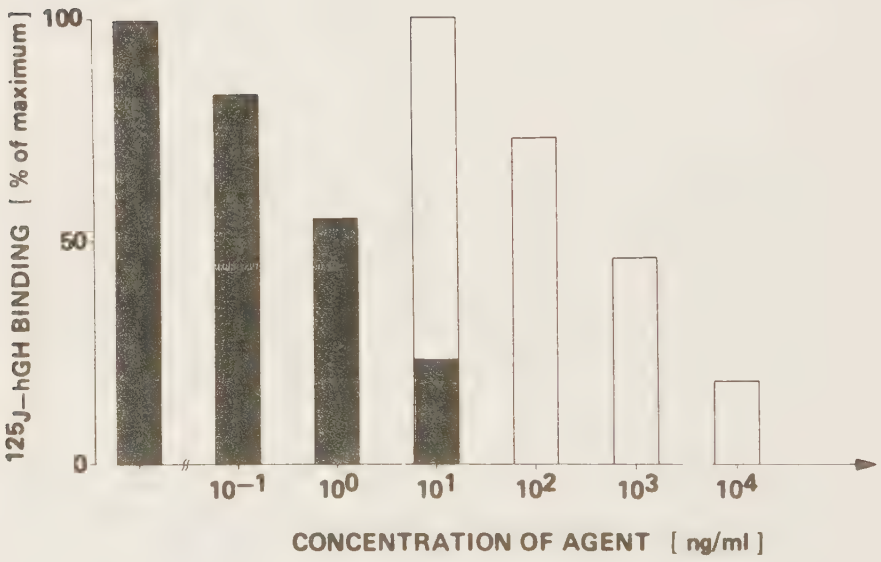


Abb. 16 BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN LYMPHOZYTEN - INTERFERENZEN DURCH RINDERSERUMALBUMIN UND TRYPSIN. Halblogarithmische Darstellung der Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen. Abszisse: Konzentration von BSA und/oder Trypsin in [ng/ml].
Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der maximalen Bindung der Standardkurve. Dunkle Säulen: Trypsinzusatz, helle Säulen: BSA-Zusatz.

3.7. Vergleich verschiedener Rezeptorsysteme

Ein Vergleich von RRA-Ergebnissen verschiedener Laboratorien und Untersucher ergibt bei Verwendung desselben Untersuchungssystems häufig große Unterschiede: Die K_a des Rattenleberplasmamembranrezeptors für hGH beträgt beispielsweise nach (20) $5.6 \times 10^9\ M^{-1}$, nach (144) aber $0.9 \times 10^9\ M^{-1}$. Die hGH-Bindung an menschlichen Lymphozyten wurde bisher nur von zwei Arbeitsgruppen beschrieben (98, 117). Beide Autorengruppen arbeiten unter Assaybedingungen, die sich stark von dem hier vorgestellten RRA unterscheiden. Für die laborinterne Plausibilitäts- und Qualitätskontrolle wurde deshalb die Bindung von hGH an Lymphozyten mit der Bindung von hGH an drei anderen Rezeptorsystemen verglichen.

Mit dem Lymphozytenrezeptorsystem waren dabei Bindungswerte für hGH zu erreichen, die denen mit anderen Rezeptorsystemen gemessenen vergleichbar waren (Tab. 14). Gegenüber isolierten und gereinigten Rezeptorpräparationen wiesen die lebenden menschlichen Zellen allerdings geringere Affinität für ^{125}J-hGH auf.

Im Vergleich zu anderen Rezeptorsystemen wird im Lymphozyten-RRA mit geringeren Bindungswerten gearbeitet. Die gefundenen Unterschiede sind allerdings dadurch zu erklären, daß Membran-RRAs mit isolierten und mindestens partiell gereinigten Rezeptorpräparationen aufgebaut sind, während eine Rezeptorkonzentrierung mit dem Lymphozyten-RRA vermieden wird, um die Rezeptor-Ligand-Interaktion an der intakten Zelle untersuchen zu können.

3.8. Charakterisierung der Rezeptor-tragenden Zelle

Die früher an Lymphozyten vermuteten Rezeptoren für Insulin sind nach neueren Erkenntnissen Monozyten-Rezeptoren (14, 275). Auch die Bindung von SM-C an Lymphozytenpopulationen soll durch Monozyten zumindest verstärkt werden (300). Insulin bindet außer an Lymphoblasten und Monozyten auch an Erythrozyten (95, 221). Die aus der hier beschriebenen 'Lymphozytenseparation' (Kap. 9.1.2.1.) hervorgehende heterogene Zellpopulation enthält neben T- und B-Lymphozyten bis zu 10% Monozyten (154). Da außerdem Granulozyten und Erythrozyten die Lymphozytenpräparationen bis zu fünf % kontaminieren (Kap. 9.1.2.1.), sollte die Zellspezifität des hGH-Rezeptors untersucht werden.

3.8.1. Granulozyten, Erythrozyten, Milzzellen

Granulozyten, Erythrozyten (Kap. 9.1.2.1.2.) und mittels der Lymphozytenseparationsmethode nach Boyum (Kap. 9.1.2.1.1.) aus Milzgewebe separierte mononukleäre Zellen (Milz eines neunjährigen Knaben mit Sphärozytose) wurden an Stelle der Lymphozyten im hGH-Bindungsassay eingesetzt.

In den Verdrängungsassays zeigten weder Granulozyten noch Erythrozyten eine spezifische hGH-Bindung (Abb. 17). Die aus Milzgewebe isolierten mononukleären Zellen dagegen banden ^{125}J-hGH spezifisch. Die Affinität dieser Zellen aber war gegenüber der peripherer Lymphozyten deutlich reduziert (Tab. 15). Schädigung der Zellen im Operationspräparat, unterschiedliche Zelltypen gegenüber peripheren Lymphozytenpopulationen und die Grunderkrankung des Zellspenders mögen für die reduzierte Bindungsfähigkeit der Milzzellen verantwortlich sein. Die hohe unspezifische, d.h. nicht verdrängbare Bindung an Granulozyten läßt sich

durch unspezifische Adhäsion an der großen Zelloberfläche und möglicherweise durch Pinozytose erklären.

Granulozyten und Erythrozyten besitzen somit keine mit dem in dieser Arbeit beschriebenen RRA nachweisbaren hGH-spezifischen Membranrezeptoren.

3.8.2. Mononukleäre Zellen, Lymphozyten, Monozyten

Mononukleäre Zellen (= 'Lymphozyten' nach Ficollseparation (Kap. 9.1.2.1.1.)), Monozyten (Kap. 9.1.2.1.3.) und Lymphozyten ohne Monozyten (Monozytenkontamination unter 2%) wurden auf ihre Fähigkeit, ^{125}J-hGH spezifisch zu binden, untersucht.

Monozyten wiesen sehr hohe B_0-Werte auf: Bei geringer Affinität des GH lassen sich so hohe Bindungswerte durch Überlagerung hoher unspezifischer Bindungswerte (wie sie der Größe der Monozyten entsprechen könnte,(siehe auch Kap. 3.8.1.) erklären. Da die Monozytenpräparationen möglicherweise durch Lymphozyten kontaminiert sind (bis zu 20%), erklären sich geringe spezifische Bindungsanteile an Monozyten durch die spezifische Lymphozytenbindung. Lymphozytenpräparationen ohne Monozyten weisen höhere Bindungswerte als mononukleäre Zellen auf. Die Affinität der Bindung ist durch die Eingrenzung der Zellpopulationen nicht verändert. Zahlenmäßige Zunahme der spezifisch hGH-bindenden Zellen würde dieses Phänomen erklären (Tab. 16). Charakteristische Verdrängungskurven für die drei verschiedenen Zellpopulationen erhärten die Auffassung von der Spezifität des Lymphozyten-Rezeptors für bestimmte Lymphozytensubpopulationen (Abb. 18).

Die hGH-Bindung an heterogenen Lymphozytenpräparationen ist nicht auf Monozytenbeimengungen zurückzuführen. Spezifische hGH-Rezeptoren sind somit an Lymphozyten zu lokalisieren, die GH-Bindung an mononukleären Zellen darf damit als 'Lymphozytenrezeptor-Interaktion' bezeichnet werden.

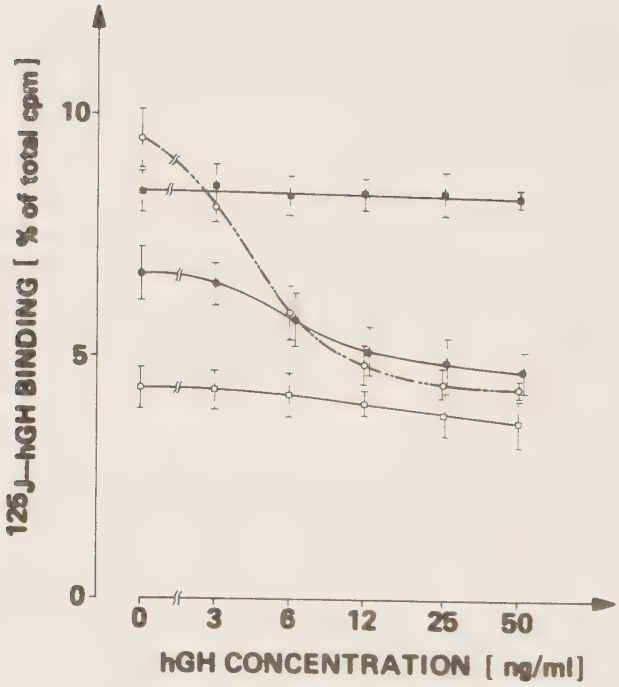


Abb. 17 VERDRÄNGUNGSKURVEN FÜR GEBUNDENES ^{125}J-hGH AN VERSCHIEDENEN IM BLUT ZIRKULIERENDEN ZELLEN - I.
Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von drei unabhängigen Doppelbestimmungen (Milzzellen nur eine Dreifachbestimmung). Abszisse: hGH-Konzentration in [ng/ml]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der eingesetzten Radioaktivität. ○ : Lymphozyten (Ficollseparation), □ : Erythrozyten, ■ : Granulozyten, ● : Milz-Lymphozyten.

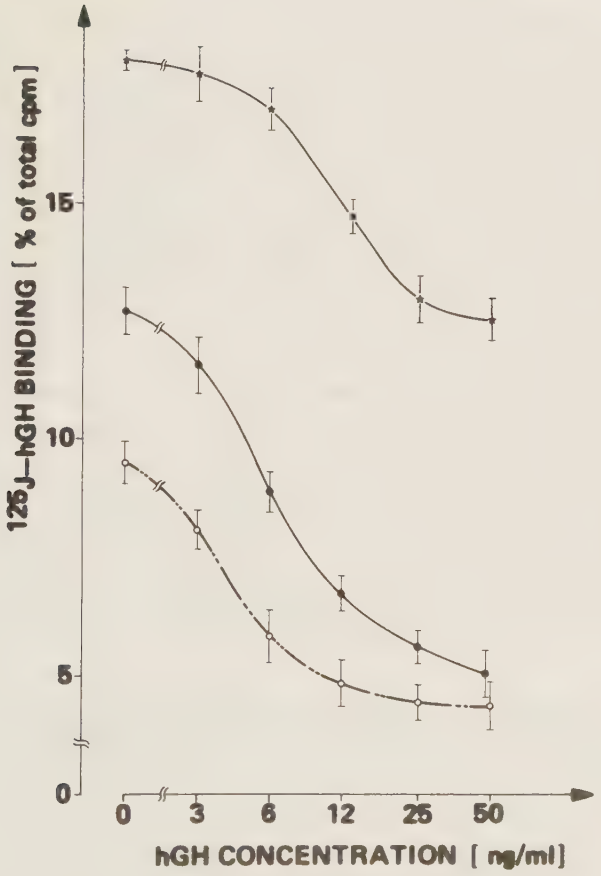


Abb. 18 VERDRÄNGUNGSKURVEN FÜR GEBUNDENES ^{125}J-hGH AN VERSCHIEDENEN IM BLUT ZIRKULIERENDEN ZELLEN - II.
Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von drei unabhängigen Dreifachbestimmungen. Abszisse: hGH-Konzentration in [ng/ml]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der eingesetzten Radioaktivität. ○ : Lymphozyten (Ficollseparation), ● : Monozyten, ✳ : Lymphozyten ohne Monozyten.

3.8.3. Zellkulturen

Im Vergleich zu peripheren Lymphozyten besitzen Lymphoblasten (IM-9-Blasten in Kultur) eine größere Rezeptorzahl für Insulin und hGH (116, 129, 196, 197). Es wird vermutet, daß Kulturbedingungen an sich zu einer Rezeptor-Expression an kultivierten Zellen führen (7, 16). Die Bindung von hGH an Zellkulturen (Laborzellinien menschlicher und tierischer Herkunft) und an transformierten Lymphoblasten in Kultur sollte untersucht werden (siehe Kap. 9.1.2.1.5.).

PHA-induzierte Lymphoblasten zeigten spezifische und hohe Bindungswerte für hGH, während Con A-induzierte Blasten GH nicht spezifisch zu binden scheinen (Tab. 18, vgl. Kap. 4.6.2.). PDe-B-1-Zellen banden GH ebenfalls spezifisch, allerdings führte eine im Vergleich zu peripheren Lymphozyten geringere Affinität für das Hormon zu einer Abflachung der Verdrängungskurven (Tab. 17). K-562-Zellen wiesen geringe B_O-Werte, geringe spezifische Bindung und niedrige K_a auf.

Die Unterschiede in den GH-Bindungswerten verschiedener Zellinien und kultivierter Zellen zeigen, daß die Kultur von Zellen zur Bindungsexpression weder notwendig ist, noch daß die Bindungsexpression durch Kulturverfahren allein zu Stande kommt. Die hGH-Bindung an PHA-Blasten wurde weiter untersucht (Kap. 4.6.2.).

3.8.4. T-Lymphozyten

Von Monozyten-Kontaminationen befreite Lymphozytenpopulationen sind ein heterogenes Zellgemisch, in dem B- und T-Lymphozyten vorherrschen (12, 113, 175). Morphologisch nicht differenzierbare Lymphozytensubpopulationen unter-

scheiden sich hinsichtlich ihrer Funktionen im Organismus ganz erheblich (251, 195). Es ist daher möglich, daß bestimmte Lymphozytensubpopulationen für die Bindung von ^{125}J-hGH in dem hier vorgestellten RRA verantwortlich sind, daß andere Subpopulationen aber GH nicht spezifisch binden. Verschiedene Inkubationsbedingungen könnten zur Expression verschiedener Eigenschaften verschiedener Lymphozytensubpopulationen führen. Dieses Phänomen wäre eine weitere Erklärung für die widersprüchlichen Befunde in Arbeiten über GH-Rezeptoren an menschlichen Lymphozyten. Die Bindung von hGH an T-Lymphozytenpopulationen sollte als erster methodischer Schritt zur Klärung dieser Fragen untersucht werden.

Die Auftrennung heterogener Zellgemische vermag zur Maskierung von Oberflächenrezeptoren führen (2.6.). Auch die zur T-Zellseparation angewandte Nylon-Methode (Kap. 9.1.2.1.4.) kann zur Unterdrückung von Bindungsphänomenen führen (229). Isolierte T-Zellen wurden deshalb sofort nach der Nylon-Säulen-Elution und nach einem achtstündigen Re-Expressionsintervall im hGH-RRA eingesetzt.

T-Zellpopulationen mit 60-85% AET-Rosetten bildenden Zellen (Nylon-I-Fraktion nach einmaliger Nylon-Säulen-Elution) zeigten nach achtstündiger Re-Expressionszeit deutlich höhere, ohne Intervall zwischen Separation und RRA aber deutlich niedrigere GH-Bindungswerte als Lymphozyten der Ficoll-Separation (Tab. 19). T-Zellpräparationen mit 85-95% AET-Rosetten bildenden Zellen banden auch nach 8h-Re-Expressionszeit deutlich weniger hGH als Lymphozyten der Ficoll-Separation (Tab. 19). Der parallele Verlauf der hGH-Verdrängungskurven von Nylon-I-Präparationen und Ficoll-Mischpopulationen (Abb. 19) mit deutlicher Erhöhung der spezifischen Bindung (Tab. 19) läßt auf eine zahlenmäßige Zunahme der hGH-bindenden Zellen schließen. Der Bindungsabfall nach zweimaliger Nylon-Säulen-Behandlung ist auf irreversible Membranveränderungen durch die Separation der Zellen zurückzuführen. Diese Erklärung entspricht der in der Literatur bevorzugten (229).

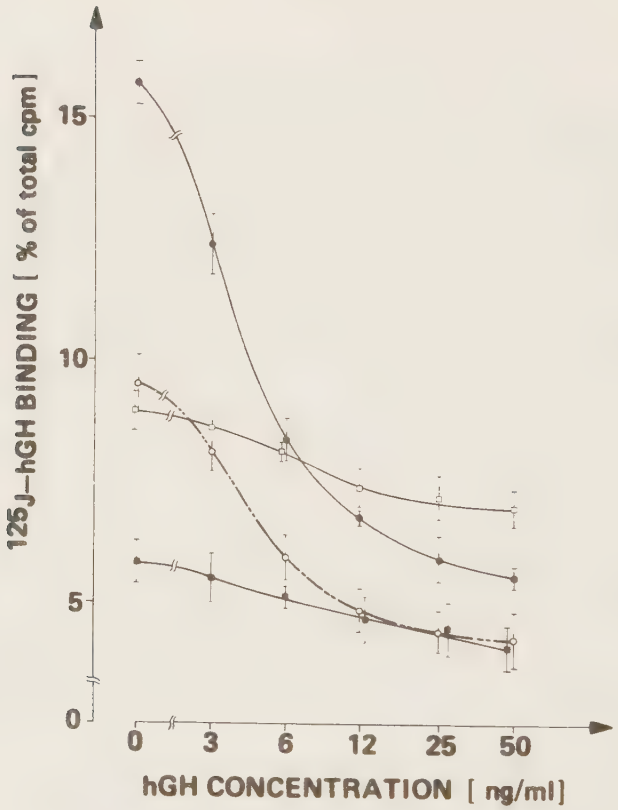


Abb. 19 VERDRÄNGUNGSKURVEN VON GEBUNDENEM ^{125}J-hGH AN T-ZELL-PRÄPARATIONEN. Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Doppelbestimmungen. Abszisse: hGH-Konzentration in [ng/ml]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der eingesetzten Radioaktivität.

○ : Lymphozyten (Ficollseparation),
□ : Nylon-I-Fraktion (sofort nach Säulenelution),
■ : Nylon-II-Fraktion (acht h nach Säulenelution),
● : Nylon-I-Fraktion (acht h nach Säulenelution).

T-Lymphozyten scheinen somit für die spezifische Bindung von hGH an mononukleären Zellen verantwortlich zu sein. Komplizierte Zellseparationsverfahren alterieren in der Regel die Zellmembran und somit die Hormon-bindenden Zellstrukturen. Eine weitergehende Charakterisierung der 'hGH-bindenden Zelle' bleibt deshalb anderen direkten Nachweismethoden der Hormonbindung mit der Möglichkeit, gleichzeitig mit der Bindung die Zellmorphologie zu untersuchen, überlassen (z.B. Fluoreszenzmikroskopie mit fluoreszenzmarkiertem hGH (98, 183).

3.9. Spezifität

Die Spezifität eines Rezeptors für ein bestimmtes Hormon gilt als erwiesen, wenn nur dieses Hormon sein radioaktiv markiertes Homolog vom Rezeptor verdrängen kann (77, 91, 108, 109, 140, 169). Es muß dementsprechend ausgeschlossen werden, daß andere Proteohormone mit dem gebundenen Tracer um den Rezeptor konkurrieren (15, 60, 120). Es wurde deshalb untersucht, ob hypothalamische und hypophysäre Hormone sowie Insulin an Lymphozyten gebundenes ^{125}J-hGH vom Rezeptor verdrängen. Fünf verschiedene GH-Präparate wurden ebenfalls auf ihre Verdrängung im RRA untersucht. An Stelle des unmarkierten hGH ('Standard') wurden im Standardassay steigende Konzentrationen des jeweiligen Hormons eingesetzt. Scatchard Plots wurden für alle Kurven berechnet.

Keines der eingesetzten Proteohormone besaß eine den verschiedenen hGH-Präparationen vergleichbare Affinität zum Lymphozytenrezeptor (Tab. 20, 21, 22, 23). Entsprechend den sehr niedrigen K_a-Werten war bei allen getesteten Hormonen eine Verdrängung des ^{125}J-hGH erst bei hohen, unphysiologischen Konzentrationen meßbar (Abb. 15). Hypophysäre Proteohormone wiesen dabei sehr viel höhere Asso-

ziationskonstanten auf als hypothalamische Hormone und Insulin. Dieser Befund ist im Einklang mit der Vorstellung molekularer Verwandtschaft der Hypophysenvorderlappen-Hormone und zeigt, daß sich diese Verwandtschaft bis auf die Rezeptorspezifität der Hormone erstreckt. Dabei ist die Spezifität des hGH für seinen Rezeptor an Lymphozyten so hoch, daß eine Bindungsverdrängung durch PRL nur mit einer 18-fach niedrigeren K_a erfolgt als dies mit hGH der Fall ist. Die 'laktogenen' Anteile und Eigenschaften des hGH-Rezeptors sind somit sehr gering: Der hGH-Rezeptor an menschlichen Lymphozyten ist nahezu ausschließlich 'somatogener' Natur.

Fünf auf ihre Bindungsverdrängung untersuchte hGH-Präparate erwiesen sich als ihren Bindungswerten nach nahezu identisch (Tab. 23). Die geringfügig höhere Assoziationskonstante des biosynthetisch hergestellten Hormons bei gering erniedrigter MBK liegt im Bereich der Streuung (Kap. 3.5.) und darf deshalb sicher nicht als Indiz für höheren Reinigungsgrad oder bessere Rezeptorwirksamkeit dieses Präparats gelten. Die identischen Bindungsparameter der fünf GH-Präparate steht im Einklang mit der klinischen Wirksamkeit, die bei allen verwendeten Präparate äquivalent zu sein scheint (34, 47, 248).

Zur Berechnung des 'spezifischen Anteils' der hGH-Bindung wurde im Standardassay in der Regel von der Gesamtbindung die Radioaktivität, die auch nach Zugabe von 50 ng unmarkierten hGHs an den Lymphozyten verblieb, subtrahiert. Der Anteil an 'unspezifischer Bindung' blieb auch bei Zusatz von höheren hGH-Konzentrationen vergleichbar (vgl. Abb. 15). Der im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen RRA-Ergebnissen hohe unspezifische Bindungsanteil erklärt sich aus einigen, in der Literatur wenig beachteten Tatsachen:

1. Auch im 'unspezifischen Bindungsanteil' verbergen sich 'spezifische Bindungsanteile', die allerdings durch Internalisation oder kovalente Bindung gerade in einem Gleichgewichtszustand irreversibel und unverdrängbar bleiben.
2. Auch bei Zugabe von hohen Hormonkonzentrationen verbleiben radioaktive Moleküle am Rezeptor.
3. In vitro ist eine 'Nachmarkierung' von unmarkierten Hormonmolekülen durch Freiwerden von Jodradikalen möglich. Die Empfänglichkeit von membrangebundenen Hormonmolekülen für solche sekundäre Markierungsprozesse mag dabei aus sterischen Gründen größer sein als die von nicht-gebundenen Molekülen.

Mit der kritischen Interpretation von Daten über die Verdrängbarkeit gebundener, radioaktiv markierter Hormone und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß eine Verdrängung gebundenen GHs von seinem Lymphozytenrezeptor nur durch homologes Hormon (hGH) erfolgt, ergibt sich, daß der Lymphozytenrezeptor für hGH für dieses Hormon tatsächlich hochspezifisch ist.

4. Rezeptorregulation und Rezeptormodulation

4.1. Theorie

Proteohormon-Rezeptoren befinden sich wie alle zellulären Proteine in einem dynamischen Umbauprozeß. Sie werden synthetisiert, im Golgi-Apparat transportiert und in die Zellmembran eingebaut (58, 108, 132, 133, 149, 150). Nach der Interaktion mit dem Liganden findet möglicherweise über eine Ligand-Rezeptor-Internalisation in die Zelle ein 'Recycling' des Rezeptormoleküls statt (108, 183). Hormonelle Regulation (102, 294), Selbstregulation durch den Liganden (132, 244), Anti-Rezeptor-Antikörper modulierte Regulation (87, 109, 171, 173, 310), Mitogen-induzierte Rezeptormodulation (183, 189) und enzymatische Rezeptorsteuerung (72-74, 91) sind für Proteohormon-Rezeptoren in vitro beschrieben worden. Die klinische Relevanz solcher Regulationsphänomene mag erheblich sein (109, 132, 143, 167, 182, 231).

4.2.1. Vorinkubationsdauer

Vorinkubation von Lymphozyten (97) und von Chondrozyten und Fettzellen (92, 93) ergibt höhere Bindungswerte für hGH an diesen Zellen. Die Vorinkubationsdauer scheint dabei den Grad der Bindungserhöhung bzw. eventuell einen endlichen Bindungsabfall zu bestimmen. Der Einfluß der Vorinkubationsdauer auf die Bindung von ^{125}J-hGH an Lymphozyten des Menschen sollte deshalb untersucht werden.

Eine Million Zellen wurden bei 37^{o}C im Schüttelwasserbad in einem ml Assayvolumen vorinkubiert. Nach verschiedenen

Vorinkubationszeiten wurden Tracer und unmarkiertes Hormon zugesetzt und der Standardassay durchgeführt. Nach 30 Min. Vorinkubation bei 37°C war bei gleicher Affinität gegenüber dem Assay ohne Vorinkubation eine Verdreifachung der Rezeptorzahl pro Zelle zu messen. Längere Vorinkubation führte zunächst zu einer Affinitätsabnahme und im weiteren Verlauf zusätzlich zu einer Abnahme der Rezeptorzahl pro Zelle (Tab. 24).

4.2.2. Temperaturkinetik der Vorinkubation

Die Temperaturabhängigkeit von Hormon-Rezeptor-Interaktionen ist wohl bekannt (36, 68, 132, 199, 206, 260, 264, 266). Die Temperaturabhängigkeit der hGH-Bindung an Lymphozyten wurde bereits in dieser Arbeit demonstriert (Kap. 3.3.2.). Verschieden lange Vorinkubation bei drei verschiedenen Temperaturen wurde auf ihren Einfluß auf die Bindung von hGH an Lymphozyten getestet.

Vorinkubation bei 4°C führte zu einem starken, von der Vorinkubationsdauer direkt abhängenden, Bindungsabfall im RRA. Vorinkubation bei höheren Temperaturen führte zunächst zu einem leichten Anstieg der hGH-Bindung an Lymphozyten, nach 60 Minuten aber ebenfalls zu einem kontinuierlichen Bindungsverlust (Abb. 20).

Während der Vorinkubation kommt es zu keinem Absterben der Zellen (keine Änderung der Trypanblauanfärbbarkeit). Auslösende Faktoren für Rezeptorverlust und Bindungsanstieg bei den entsprechenden Vorinkubationsbedingungen sind nicht bekannt. Am ehesten führt längere Irritation der Zellen durch das Schüttelwasserbad (vgl. Kap. 2.5. und Kap. 3.3.2.) zu einem Bindungsabfall, während die verbesserte Bindungsfähigkeit nach kurzer Vorinkubation mit Re-Expressionsphänomenen erklärt werden könnte (vgl. Kap. 2.6.).

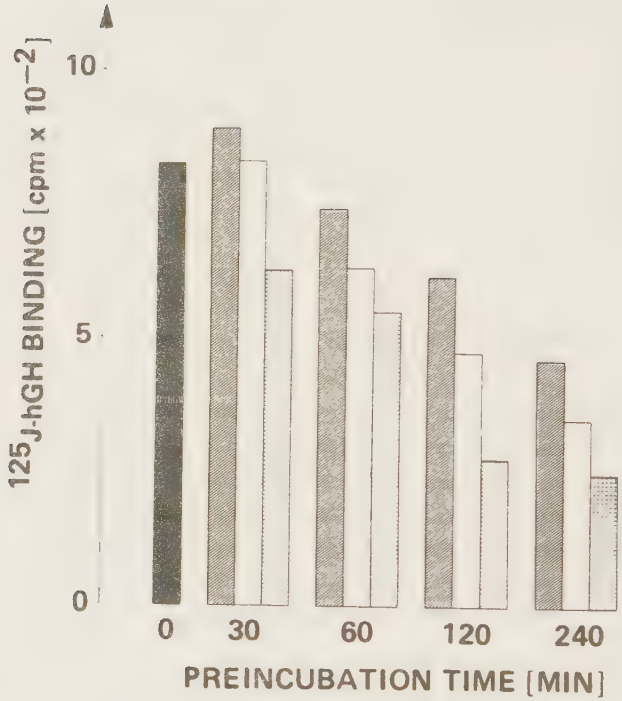


Abb. 20 <u>^{125}J-hGH-BINDUNG AN LYMPHOZYTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORINKUBATION DER ZELLEN.</u> Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen.
Abszisse: Vorinkubationszeit in [Min.].
Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in [cpm x 10^{-2}].
Alle Vorinkubationen wurden im Schüttelwasserbad mit je einer Million Zellen pro Plastiktube durchgeführt. Schwarze Säule: ohne Vorinkubation, schraffierte Säulen: Vorinkubation bei 37°C, karierte Säulen: Vorinkubation bei 4°C, helle Säulen: Vorinkubation bei 30°C.

4.3.1. Vorinkubation mit Hormonen

Hormonrezeptoren scheinen durch heterologe Hormone und durch die Bindung von homologem Hormon selbst reguliert zu werden (5, 41, 55, 119, 141, 144, 170, 206, 227, 237, 262, 290). Auch für hGH-Rezeptoren in tierischen und menschlichen Geweben sind heterologe (20, 22, 102) und homologe (90, 149, 199) hormonelle Einflüsse auf die Bindung bekannt. Die Rolle heterologer Hormone (PRL, Insulin und Dexamethason) und zwei verschiedener Dosen von hGH (25 ng und 100 ng pro Ansatz) in der Bindungsregulation nach 60-minütiger Vorinkubation wurde getestet. Dabei war die 60-minütige Vorinkubationsdauer gewählt worden, da nach dieser Zeit bei 37°C nur ein geringer Bindungsverlust bei Vorinkubation ohne Zusatz zu verzeichnen war (Kap. 4.2.1. und Kap. 4.2.2.). 30-minütige Vorinkubation erschien nach Durchsicht der Literatur als zu kurz, um die Effektivität oder Nicht-Effektivität einer hormonellen Regulation beurteilen zu können.

Nach 60 Minuten Vorinkubation mit und ohne Hormone wurden die Zellen in Assaypuffer gewaschen (zweimaliges 20-minütiges Zentrifugieren bei 280 g und 4°C) und der Standardassay durchgeführt. Vorinkubation mit zwei verschiedenen Dosen von hGH führte zu einem Abfall der Affinität und in der höheren Konzentration zu einem zusätzlichen Abfall der Rezeptorzahl pro Zelle (Tab. 25). PRL und Dexamethason (wegen seiner bekannten vielschichtigen Wirkung auf Lymphozyten probatorisch als einziges Nicht-Proteohormon untersucht) hatten in der eingesetzten Dosis keinen Effekt auf die hGH-Bindung am Lymphozytenrezeptor (Tab. 25). Vorinkubation mit 20 ng Insulin pro Ansatz dagegen führte zu einer Verdoppelung der Rezeptorzahl pro Zelle und der MBK. Die Affinität des Rezeptors für hGH blieb nach Insulin-Exposition der Zelle unverändert.

Hinweise für heterologe und homologe hormonelle Regulation des GH-Rezeptors an Lymphozyten sind damit gegeben. Die Tatsache, daß durch Vorinkubation der Zellen mit hGH nicht etwa die Rezeptorzahl sondern der Rezeptor selbst, d.h. die K_a für hGH im RRA, verändert wird, spricht dafür, daß der nach GH-Vorinkubation beobachtete Bindungsverlust nicht durch Kompetition (etwa durch unvollständige Waschvorgänge) sondern durch 'Down-Regulation' am Rezeptor selbst verursacht wird. Dies steht im Einklang mit ähnlichen in der Literatur beschriebenen Beobachtungen an anderen Rezeptorsystemen (s.o.).

4.3.2. Kinetik der Hormonvorinkubation

Die Rolle verschiedener Hormone in der Modulation der GH-Bindung an Lymphozyten sollte in Versuchen über die Zeitkinetik solcher hormoneller Regulation weiter untersucht werden.

Östradiol (25 ng/ml) reduzierte die hGH-Bindung an Lymphozyten schon nach kurzen Vorinkubationszeiten. hGH-Vorinkubation (25 ng/ml) bewirkte bei 30-minütiger Vorinkubation einen minimalen Anstieg der GH-Bindung im RRA, bei längeren Vorinkubationszeiten kam es zu dem bereits beschriebenen Bindungsabfall (Kap. 4.3.1.). Vorinkubation mit PRL (25 ng/ml) änderte das GH-Bindungsverhalten des Lymphozytenrezeptors im Vergleich zu einfacher Vorinkubation ohne Hormonzusatz nicht. Dagegen führte der Zusatz von ACTH und Insulin (je 25 ng pro Vorinkubationsansatz) zu einem deutlichen Bindungsanstieg, der bei der Insulin-Vorinkubation sowohl ein größeres Ausmaß erreichte als auch länger andauerte als bei ACTH-Behandlung (Abb. 21).

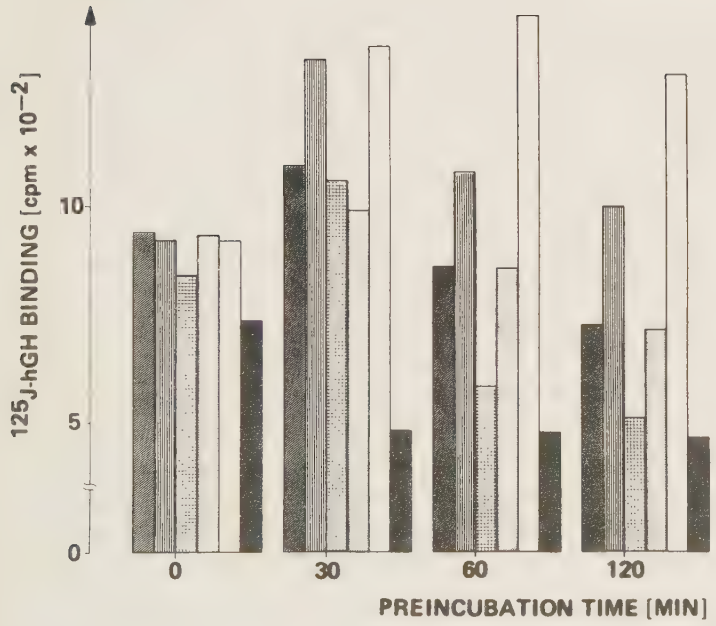


Abb. 21 ^{125}J-hGH-BINDUNG AN LYMPHOZYTEN NACH VORINKUBATION DER ZELLEN MIT VERSCHIEDENEN HORMONEN.
Mittelwerte von fünf unabhängigen Doppelbestimmungen.
Abszisse: Vorinkubationsdauer in [Min.].
Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in [cpm x 10^{-2}].
Schräg schraffierte Säule: ohne Hormonzusatz.
Senkrecht linierte Säule: mit 25 ng ACTH, karierte Säule: mit 25 ng hGH, gepunktete Säule: mit 25 ng PRL, helle Säule: mit 25 ng Insulin, dunkle Säule: mit 25 ng Östradiol.

Down-Regulation durch GH selbst und Bindungsverbesserung durch Vorinkubation mit Insulin und ACTH sind für den Lymphozytenrezeptor für hGH damit belegt. Die Regulation durch antagonistische Hormone mag dazu dienen, in vivo synergistische und antagonistische Hormonwirkung auf Rezeptorebene gegensinnig zu modulieren. Die Feinregulation von wechselnden Hormonspiegeln könnte somit auf Rezeptorebene erfolgen.

4.4.1. Vorinkubation mit Trypsin und Antitrypsin

Verschiedene Enzyme wurden auf ihre Wirkung an Hormonrezeptoren untersucht (72-74, 91, 129, 176, 279). Vor allem die proteolytische Aktivität von Trypsin wurde an Rezeptorsystemen in vitro zur Modulation und Manipulation der Hormonbindung eingesetzt (60, 73, 129, 187, 197, 318). Unter der Annahme, daß der GH-Rezeptor an Lymphozyten ein komplexes Peptidmolekül darstellt, das durch Proteolyse in seiner Funktion gestört werden kann, wurden Trypsin und Antitrypsin in Vorinkubationsversuchen mit menschlichen Lymphozyten für den hGH-RRA eingesetzt.

60 Minuten lang wurden jeweils eine Million Zellen bei 37°C im Schüttelwasserbad mit Trypsin, Antitrypsin und mit beiden Substanzen vorinkubiert. Die Zellen wurden dann zweimal 20 Minuten lang in Assaypuffer zentrifugiert (siehe Kap. 4.3.1.) und anschließend im Standardassay auf ihre hGH-Bindung untersucht: Trypsinierung reduzierte die spezifische Bindung über Verminderung der K_a drastisch. Durch Antitrypsin wurde der bindungshemmende Effekt von Trypsin aufgehoben. Darüber hinaus führte Antitrypsin allein zu einer dosisabhängigen Zunahme der Affinität des GH-Rezeptors für hGH (Tab. 26). Von 1000 bis 10 000 KIE Antitrypsin pro Ansatz ergab sich kein weiterer Anstieg der Bindung, eine Plateaufunktion ist in diesem Bereich anzu-

nehmen (Daten nicht gezeigt). Die entsprechenden Verdrängungskurven der hGH-Bindung nach Vorinkubation mit Trypsin und Antitrypsin illustrieren die Rezeptorveränderungen und zeigen die Dosisabhängigkeit derselben (Abb. 23).

Vorinkubation von menschlichen Lymphozyten mit Trypsin bringt die Bindung von hGH an solchen Zellen zum Verschwinden. Zusatz von Antitrypsin zum Vorinkubationsmedium mit Trypsin neutralisiert diesen Effekt. Darüber hinaus hat Antitrypsin eine dosisabhängige, die Affinität des Rezeptors steigernde Wirkung, die nicht durch die antiproteolytische Wirkung allein erklärt werden kann.

4.4.2. Kinetik der Antitrypsinvorinkubation

Die Zeitkinetik einer Vorinkubation mit Trypsin und Antitrypsin sollte untersucht werden, um weitere Aufschlüsse über die Regulation der ^{125}J-hGH-Bindung an Lymphozyten durch proteolytische und Proteolyse-hemmende Aktivitäten zu gewinnen.

Vorinkubation mit Trypsin führte zu drastischem Bindungsrückgang (Kap. 4.4.1.). Dieser Effekt hing nicht von der Dauer der Vorinkubation ab (Daten nicht gezeigt). Dagegen zeigte die dosisabhängige Bindungssteigerung nach Antitrypsin-Vorinkubation ein charakteristisches Zeitprofil: Maximale Bindung wurde nach 30 Minuten Vorinkubation erreicht (vgl. Kap. 4.2.1.), bis 120 Minuten Vorinkubation brachten einen plateauähnlichen Bindungsverlauf mit allen eingesetzten Antitrypsin-Konzentrationen, mit 240 Minuten Vorinkubation konnten auch hohe Dosen einen Bindungsabfall nicht verhindern (Abb. 22).

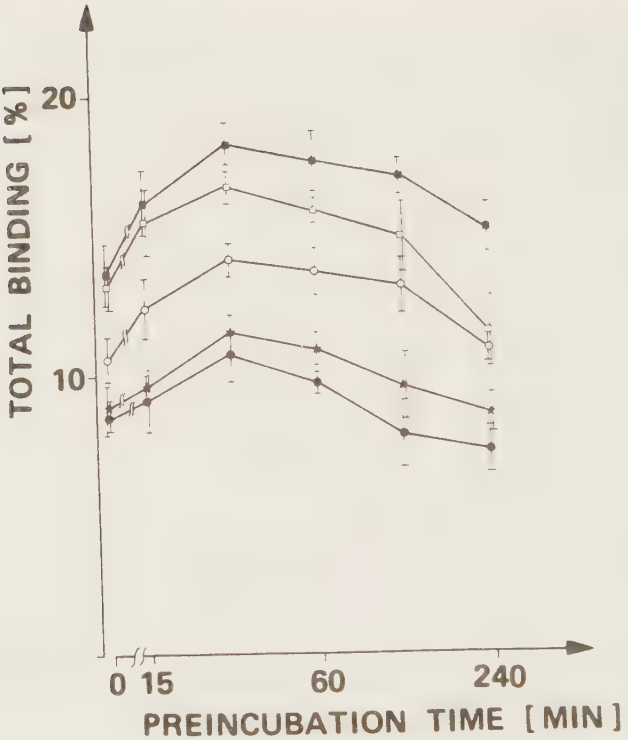


Abb. 22 ^{125}J-hGH-BINDUNG AN LYMPHOZYTEN NACH VORINKUBATION MIT ANTITRYPSIN. Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von drei unabhängigen Dreifachbestimmungen. Abszisse: Vorinkubationsdauer in [Min.] . Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der eingesetzten Radioaktivität.
● : ohne Zusatz, ✳ : mit 10 KIE Antitrypsin,
○ : mit 100 KIE Antitrypsin, ■ : mit 1000 KIE Antitrypsin, □ : mit 10 000 KIE Antitrypsin.

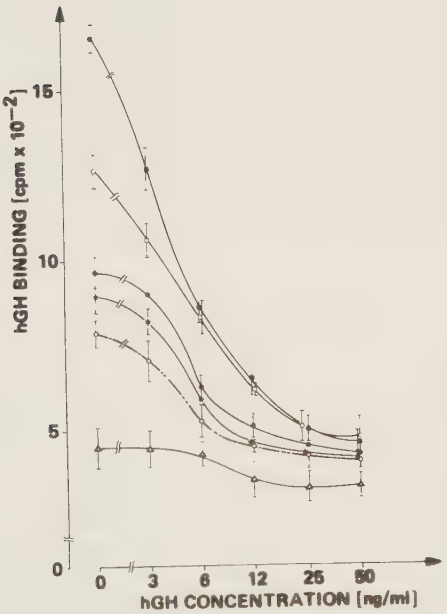


Abb. 23 VERDRÄNGUNGSKURVEN FÜR GEBUNDENES ^{125}J-hGH NACH VORINKUBATION MIT TRYPSIN UND ANTITRYPSIN.
Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen. Abszisse: Nicht radioaktiv markiertes hGH in [ng/ml]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in [cpm x 10^{-2}]. ○ : ohne Zusatz, ● : mit 10 KIE Antitrypsin, □ : mit 100 KIE Antitrypsin, ■ : mit 1000 KIE Antitrypsin, △ : mit Trypsin (10 ng), ✳ : mit Trypsin (10 ng) und 1000 KIE Antitrypsin.

Die beobachtete Wirkung von Antitrypsin auf den hGH-Rezeptor geht über einen Neutralisationseffekt der Trypsin-Proteolyse hinaus. Möglicherweise vermag Antitrypsin als Enzyminhibitor sehr rasch Membranprozesse zu beeinflussen und damit eine Expression hGH-bindender Proteine zu induzieren bzw. über sterische Veränderungen am Rezeptormolekül dessen Affinität zu steigern. Dabei sind schon niedrige Konzentrationen Antitrypsin wirksam. Die K_a des hGH-Rezeptors an lebenden Zellen wird durch kurze Antitrypsinbehandlung in den Bereich von K_a-Werten isolierter Rezeptorpräparationen angehoben.

4.4.3. Inkubation mit Trypsin und Antitrypsin

Trypsin und Antitrypsin beeinflussen die Bindung von hGH an Lymphozyten, wenn diese Zellen mit dem entsprechenden Agens vorinkubiert werden (Kap. 4.4.1.-2.). Es sollte untersucht werden, ob Antitrypsin und Trypsin den RRA selbst während der Inkubation mit ^{125}J-hGH modulieren.

Wie in den Vorinkubationsstudien (Kap. 4.4.1.-2.) führte Antitrypsin dosisabhängig zu einer Steigerung der Rezeptoraffinität für ^{125}J-hGH. Die Rezeptorzahl blieb dagegen auch in diesen Versuchen nahezu konstant, erst bei sehr hohen Dosen Antitrypsin kam es auch zu einem Anstieg der MBK. Zwischen 1000 KIE und 10 000 KIE scheint ein Plateau der maximalen GH-Bindung erreicht zu sein (Tab. 27). Trypsin führte zu einem durch Antitrypsin aufhebbaren Abfall der MBK wie auch der K_a. Da in Inkubationsstudien auch Tracer und Standards durch Trypsin verändert werden, ist die Aussagekraft dieser Studien eingeschränkt. Mit den Ergebnissen der Vorinkubationsstudien ergibt sich aber ein zusammenhängendes Bild: Trypsin führt zu einem 'Rezeptor-Break-Down' an der Lymphozytenoberfläche, der durch Proteolysehemmer verhindert werden kann.

Antitrypsin steigert die Rezeptoraffinität des GH-Lymphozytenrezeptors in den Inkubationsstudien ebenso wie in den Vorinkubationsversuchen (Darstellung von Scatchard Plots der hGH-RRAs bei Zusatz von Trypsin und Antitrypsin zum Inkubationsmedium mit steilem Verlauf der Verdrängungsgeraden bei hoher Rezeptoraffinität: Abb. 25). Elimination von Trypsinaktivitäten aus dem Inkubationsmedium spielt bei niedrigen Antitrypsinkonzentrationen eine Rolle, kann aber nicht den starken Affinitätszuwachs in höheren Dosen erklären. Ein spezifischer Membraneffekt des Antitrypsins sollte dafür verantwortlich sein.

4.4.4. Kinetik der Antitrypsininkubation

Der Einfluß der Inkubationsdauer auf die ^{125}J-hGH-Bindung an menschlichen Lymphozyten wurde bei Anwesenheit von Antitrypsin und Trypsin im Assaypuffer untersucht.

Trypsin führte unabhängig von der Inkubationsdauer zu einer Halbierung der Bindungswerte und schließlich zu einer Abflachung der Inkubationskinetik, die ohne Zusatz von proteolytischen Aktivitäten nach 120 Minuten Inkubation ein Bindungsmaximum zeigte (Kap. 3.3.2.). Die Anwesenheit von Antitrypsin erhöhte die Bindung unabhängig von der Inkubationsdauer, führte darüber hinaus auch zu einer ausgeprägten Plateauphase, die deutlich länger dauerte, als die ohne Antitrypsin beschriebene Bindungskinetik erwarten ließ (Abb. 24).

Antitrypsin vermag somit durch Trypsinkontaminationen verursachte Störungen des Bindungsgleichgewichts in der hGH-Bindungskinetik zu verhindern. Die Bindungsmodulation durch Antitrypsin-spezifische Effekte ist darüber hinaus schon nach kurzer Inkubationszeit feststellbar, d.h. setzt schnell ein, und hält lange Zeit an, was auf strukturelle eher denn funktionelle Veränderungen am Rezeptor schließen läßt.

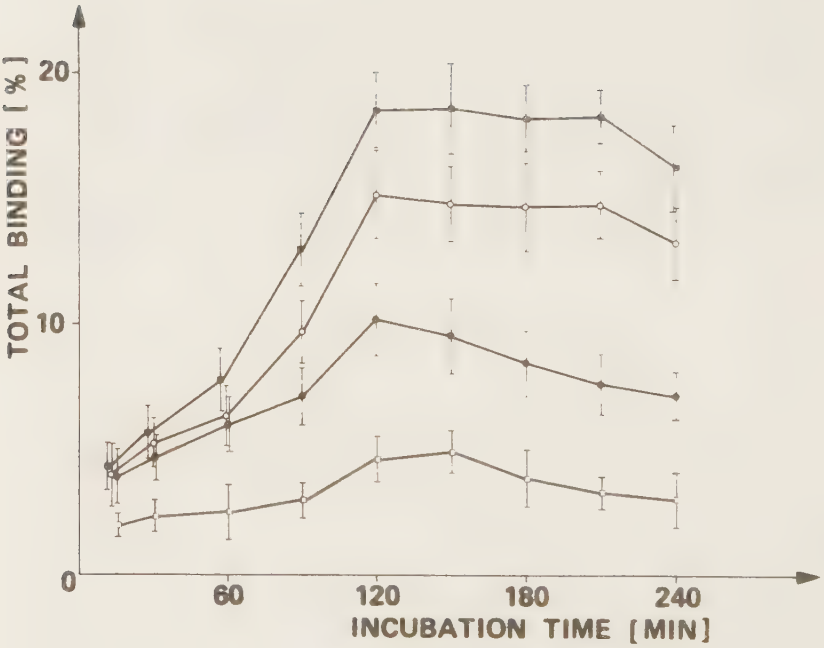


Abb. 24 BINDUNGSKINETIK VON ^{125}J-hGH AN LYMPHOZYTEN BEI INKUBATION MIT TRYPSIN UND ANTITRYPSIN.
Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Dreifachbestimmungen. Abszisse: Inkubationszeit in [Min.]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der eingesetzten Radioaktivität. ●: ohne Zusatz, ○ : mit 10 KIE Antitrypsin, ■ : mit 1000 KIE Antitrypsin, □ : mit Trypsin (10 ng).

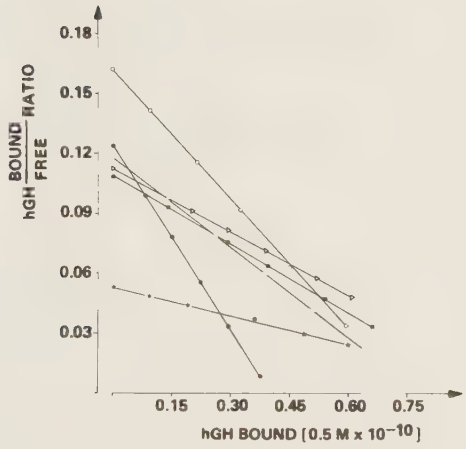


Abb. 25 VERDRÄNGUNGSKURVEN FÜR GEBUNDENES ^{125}J-hGH BEI INKUBATION MIT ANTITRYPSIN UND TRYPSIN. - SCATCHARD GRAPHS -. Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen. Abszisse: Gebundenes hGH in [0.5 x 10^{-10}M]. Ordinate: Relation des gebundenen zum ungebundenen hGH im Ansatz. Die Steigung der Geraden entspricht der K_a der Bindung, der Y-Abschnitt entspricht der MBK. △ : ohne Zusatz, ■ : mit 10 KIE Antitrypsin, □ : mit 100 KIE Antitrypsin, ● : mit 1000 KIE Antitrypsin, ○ : mit 10 000 KIE Antitrypsin, ✱ : mit 10 ng Trypsin.

4.5. Vorinkubation mit sogenanntem SM-B

Enzyme und Enzyminhibitoren spielen bei allen Stoffwechselprozessen eine Rolle (73, 75). Enzyminhibitor-Aktivität haben auch Wachstumsfaktoren (123). SM-B, ein hGH-abhängiger Faktor, besitzt trypsin inhibierende Eigenschaften und strukturelle Ähnlichkeit mit Trypsininhibitoren (112, 138, 280, 308). Die beschriebene hGH-Rezeptor-Modulation durch Antitrypsin bekommt mit dieser Erkenntnis besondere Bedeutung für die Wachstumsregulation in vivo (siehe Kap. 6.4. und Kap. 6.6.).

Vorinkubationsversuche mit verschiedenen Dosen SM-B, SM-B und Anti-SM-B-Antiserum sowie Anti-SM-B-Antiserum allein für 60 Minuten Vorinkubation bei 37°C sollten die Wirkung von SM-B auf die hGH-Bindung an menschlichen Lymphozyten klären.

Unter Vorinkubation mit SM-B stieg die Affinität des Lymphozytenrezeptors bis zum Siebenfachen der Kontrollzellen ohne SM-B-Vorinkubation an (Tab. 28). Anti-SM-B-Antiserum hob diesen Effekt völlig auf. Hochkonzentrierte Antiserum-Konzentrationen reduzierten die hGH-Bindung an Lymphozyten zwar erheblich, dieser Effekt ist aber wohl als unspezifischer Proteineffekt dieser Serumkonzentrationen zu werten, während die Anti-SM-B-Wirkung bei niedrigen Serumkonzentrationen (10^{-5}) als gegen SM-B spezifisch anzusehen sein dürften (Tab. 28). Der dosisabhängige Anstieg der Bindung von hGH nach Vorinkubation von Lymphozyten mit SM-B ist in Abb. 27 gesondert dargestellt: Dabei ist zu beachten, daß die höchsten in diesen Versuchen eingesetzten Konzentrationen noch unter den physiologischen SM-B-Spiegeln im Plasma lagen (315). Der Verlauf der Verdrängungskurven zeigt, daß die Bindung nach SM-B-Vorinkubation der ^{125}J-hGH-Bindung nach Vorinkubation ohne Zusatz in ihrer Charakteristik entspricht (Abb. 26).

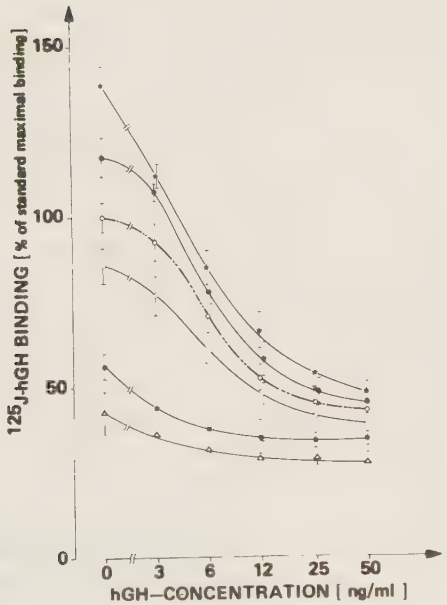


Abb. 26 VERDRÄNGUNGSKURVE VON GEBUNDENEM ^{125}J-hGH NACH VORINKUBATION MIT SM-B UND ANTI-SM-B-ANTISERUM. Halblogarithmische Darstellung von zwei unabhängigen Dreifachbestimmungen. Abszisse: Nicht radioaktiv markiertes hGH in [ng/ml]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der maximalen Bindung des Standardassays. ○ : ohne Zusatz, ● : mit 100 ng SM-B, ✱ : mit 1000 ng SM-B, □ : mit 1000 ng SM-B und Anti-SM-B-Antiserum (100/ul 1:10^5), ■ : mit Anti-SM-B-Antiserum (100/ul 1:10^3), △ : mit Anti-SM-B-Antiserum (100/ul 1:10^2).

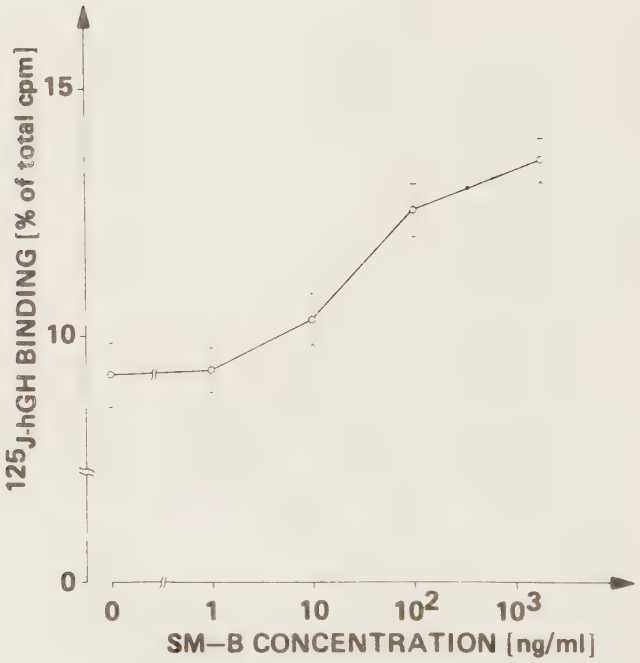


Abb. 27 ^{125}J-hGH-BINDUNG AN LYMPHOZYTEN NACH VORINKUBATION MIT SM-B. Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von drei unabhängigen Doppelbestimmungen. Abszisse: Somatomedin-B in [ng/ml]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der eingesetzten Radioaktivität.

SM-B scheint ein potenter Stimulus für die Expression von hGH-Rezeptoren an Lymphozyten zu sein, bzw. einen erheblichen Einfluß auf die Affinität (K_a) dieser Bindungsstellen zu haben. Die hypothetische Stellung des SM-B in der Wachstumsregulation, die mit den hier gezeigten Studien denkbar wird, ist in Kap. 6.6. dargestellt.

4.6.1. Vorinkubation mit Mitogenen

Zunahme (95, 189) und Abnahme (13, 70) der Rezeptoraffinität von Proteohormonrezeptoren nach Stimulation von Rezeptor-tragenden Zellen mit Mitogenen sind beschrieben. An Lymphozyten wurde nach PHA-induzierter Blastentransformation eine um das Fünffache erhöhte hGH-Bindung gegenüber unstimulierten Zellen gefunden, allerdings bezeichneten die Autoren (148) diese Bindung als unspezifisch. Um den Effekt von Mitogenen ohne Transformationsinduktion zu untersuchen, wurden Lymphozyten mit verschiedenen Dosen zweier Mitogene 60 Minuten lang bei 37°C vorinkubiert (analog Kap. 4.3.1. und Kap. 4.4.1.).

Einstündige Vorinkubation mit drei Dosen Con A (8/ug, 16/ug, 32/ug) führte gegenüber ohne Mitogen inkubierten Zellen zu keiner Veränderung der hGH-Bindung (K_a = 1.5×10^9 bis 1.7×10^9 M^{-1}, MBK = 5.7×10^{-11} bis 6.2×10^{-11} M/10^6 Zellen)[x]. Vorinkubation mit 5/ug und 12/ug PHA hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Bindung von ^{125}J-hGH an Lymphozyten. 25/ug PHA aber erhöhten die K_a des Lymphozytenrezeptors (K_a = 1.6×10^9 bis 1.7×10^9 M^{-1} in den niedrigen PHA-Dosen (5/ug), gegenüber K_a = 2.3×10^9 M^{-1} bei 25/ug PHA, MBK bei allen Konzentrationen 5.6×10^{-11} bis 6.5×10^{-11} M/10^6 Zellen)[x]. Die kurzzeitige Mitogen-Exposition führte an den Zellen zu keiner Blastentransformation und entsprechend zu keiner über den ^{3}H-TdR-Einbau meßbaren Zellproliferation (182).

---

[x] Range von drei unabhängigen Dreifachbestimmungen

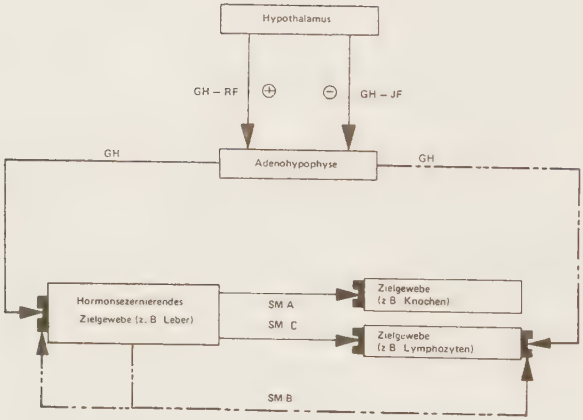


Abb. 28 WACHSTUMSREGULATION DURCH hGH - HYPOTHETISCHER REGELKREIS AUF REZEPTOREBENE. Das hypothalamisch gesteuerte hGH wirkt direkt am Zielgewebe, dessen Affinität es über negative Rückkopplung (Down-Regulation des Rezeptors) beeinflußt. Die durch hGH freigesetzten Somatomedine wirken ebenfalls direkt am Zielgewebe. SM-ähnliche Substanzen (SM-B) steigern darüber hinaus aber noch die Affinität des Zielgewebes für hGH (= Rezeptor).

PHA-induzierte Membranveränderungen (274) sind möglicherweise ohne Blastentransformation in der Lage, die Bindung von hGH an Lymphozyten über eine Affinitätssteigerung des hGH-Rezeptors zu erhöhen.

4.6.2. Mitogen-induzierte Lymphoblastentransformation

Laborzellinien transformierter Zellen besitzen mehr Insulin- und hGH-Rezeptoren als periphere, unstimulierte Zellen (116, 129, 196, 197). Einzelne Transformationsbedingungen sind untersucht worden, um den Einfluß von Kulturbedingungen auf die hGH-Bindung an menschlichen Zellen zu bestimmen (Kap. 3.8.3.). Es sollte nun geklärt werden, ob die Lymphoblastenproliferation eine Änderung der hGH-Bindung an den entsprechenden Zellen bewirkt und ob die hGH-Bindung vom Funktionszustand der bindenden Zellen abhängt.

Der TdR-Einbau (d.h. der Grad der Proliferation) und die Bindung von hGH an mitogen-stimulierten Zellen wurden miteinander verglichen. PHA-Induktion und Con A-Induktion nach vier Tagen und nach sieben Tagen Inkubation bei $37^{o}C$ und 5% CO_2 im Brutschrank führten zur Blastenproliferation der eingesetzten menschlichen Zellen (182). Die Bindung von ^{125}J-hGH an transformierten Zellen war stets nach PHA-Induktion höher als an unstimulierten Kontrollzellen. Maximale Bindungswerte wurden nach viertägiger Transformationsinduktion mit 12 µg PHA gemessen (Tab. 29 und 30). Con A-Induktion führte zu einem Abfall der Bindung von hGH an den entsprechenden Blasten (Tab. 29 und 30). Eine Korrelation zur Höhe des gemessenen ^{3}H-TdR-Einbaus bestand nicht.

PHA-induzierte Blasten besitzen hochspezifische GH-Rezeptoren, deren Zahl pro Zelle weit höher ist als die GH-

Rezeptorzahl an peripheren Lymphozyten (nach vier Tagen Blastentransformation: MBK = 13.5 x 10^{-11} bis 24.5 x 10^{-11} M/10^6 Zellen, nach sieben Tagen Blastentransformation: 14.7 x 10^{-11} M/10^6 Zellen)[x]. Da auch die Affinität dieses Rezeptors gegenüber dem Lymphozytenrezeptor erhöht ist (K_a = 2.0 x 10^9 bis 2.7 x 10^9 M^{-1})[x] ergeben sich weit höhere GH-Bindungswerte an Blasten als an Lymphozyten (Abb. 29). Die niedrigen Bindungswerte an Con A-Blasten dagegen sind bei ähnlich hohen MBKs wie an PHA-Blasten durch sehr geringe K_as zu erklären: K_a = 0.04 x 10^9 bis 0.2 x 10^9 M^{-1})[x].

Diese Daten zeigen, daß PHA-induzierte Blasten, die Zellpopulationen mit hohem T-Zellanteil und mit Zellen großer Zelloberfläche darstellen (274), hGH spezifisch binden. Lymphoblasten weisen dabei eine höhere Anzahl Rezeptoren pro Zelle auf als unstimulierte periphere Lymphozyten. Con A-transformierte Zellen hingegen binden GH nur mit sehr niedriger Affinität. Da keine mathematische Korrelation mit dem Proteinumsatz, gemessen als ^{3}H-TdR-Einbau (182), besteht, ist es wenig wahrscheinlich, daß die hohen Bindungswerte an PHA-Blasten den Funktionszustand dieser Zellen widerspiegeln. Eher führt die Alteration der Zelloberfläche durch das Mitogen zur Expression der GH-Bindung oder wird im Rahmen des allgemein erhöhten Protein-turn-over in Lymphoblasten auch die Rezeptorzahl für hGH an der Oberfläche erhöht. Möglicherweise sind Größenunterschiede zwischen Lymphozyten und Lymphoblasten eine weitere Ursache der Bindungsunterschiede.

---

[x] Range von drei unabhängigen Doppelbestimmungen

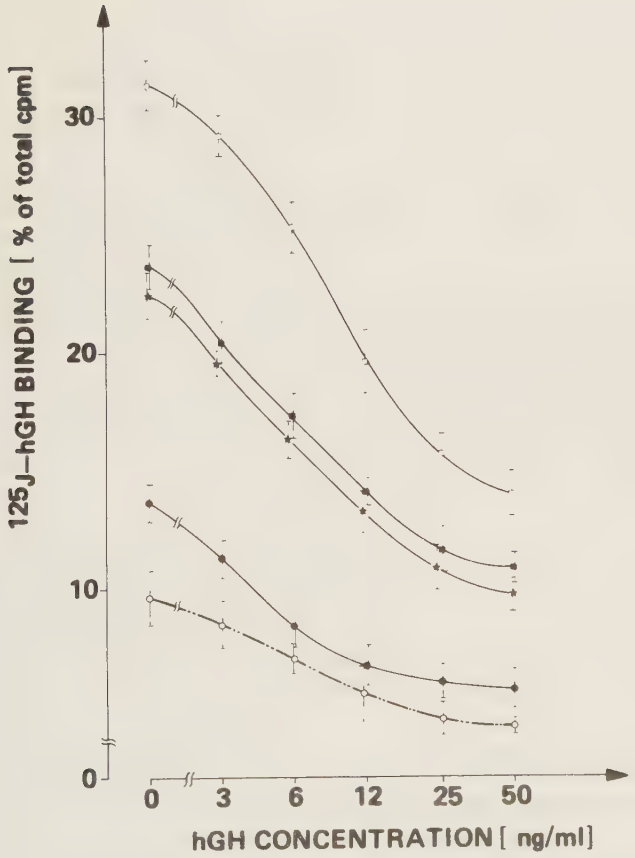


Abb. 29 VERDRÄNGUNGSKURVEN FÜR GEBUNDENES ^{125}J-hGH NACH MITOGEN-EXPOSITION UND BLASTENTRANSFORMATION.
Halblogarithmische Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen von drei unabhängigen Doppelbestimmungen. Abszisse: Nicht radioaktiv markiertes hGH in [ng/ml]. Ordinate: ^{125}J-hGH-Bindung in Prozent der eingesetzten Radioaktivität. ○ : Standardkurve, ● : vier Tage Blastentransformation mit 5 µg PHA, □ : vier Tage Blastentransformation mit 12 µg PHA, ■ : vier Tage Blastentransformation mit 25 µg PHA, ✳ : sieben Tage Blastentransformation mit 25 µg PHA.

5. Klinische Untersuchungen

5.1.1. Gesunde Probanden

Autoren, die selbst keine hGH-Rezeptoren an menschlichen Lymphozyten nachweisen konnten, kommentierten den Nachweis solcher Bindungsstellen durch andere Untersucher mit dem Hinweis, daß die 'Bindung von hGH an Lymphozyten wahrscheinlich ein seltenes, nicht ubiquitär an Lymphozyten des Menschen vorkommendes Phänomen' sei (148). Der Nachweis von hGH-Rezeptoren an Lymphozyten eines ausreichend großen Kollektivs gesunder Blutspender ist bisher in der Literatur tatsächlich nie geführt worden.

Bindungswerte von ^{125}J-hGH an Lymphozyten von 44 gesunden männlichen und 28 gesunden weiblichen Probanden wurden bestimmt. Das Durchschnittsalter der Probanden betrug 33.4 Jahre, der jüngste Proband war dabei ein Jahr alt, der älteste 79 Jahre. 15 Studenten, 20 im Krankenhaus beschäftigte Personen und 37 rekonvaleszente Patienten waren die Lymphozytenspender.

Typische Bindungsparameter für die ^{125}J-hGH-Bindung wurden an den Lymphozyten von allen Blutspendern gefunden (Tab. 31).

Die Variationskoeffizienten für die K_as und den durch 25 ng unmarkierten hGH-Standard verdrängbaren Bindungsanteil entsprachen den VKs der Assay-Serien an Lymphozyten einzelner Probanden (siehe Reproduzierbarkeit Kap. 3.5.). Die übrigen Bindungsparameter wiesen Abweichungen (als VK) von ca. 20% auf. Da diese VK-Werte höher waren als die bei einzelnen Probanden in der Assay-Serie gefundenen (Kap. 3.5.), wurde vermutet, daß die Probandengruppe heterogen war.

hGH-Rezeptoren waren an Lymphozyten von 72 gesunden Blutspendern nachweisbar. GH-Bindung scheint damit ein ubiquitär an Lymphozyten des Menschen vorkommendes Phänomen zu sein.

5.1.2. Altersabhängigkeit

Es ist bekannt, daß die Bindung von Proteohormonen an Geweben tierischer und menschlicher Herkunft vom Alter der Gewebsspender abhängig ist (64, 146, 178, 215). Es wurde deshalb untersucht, ob einzelne Bindungsparameter mit dem Alter der Lymphozytenspender korrelieren.

Tatsächlich fand sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Alter gesunder, männlicher Lymphozytenspender und der MBK für hGH an ihren Lymphozyten (Abb. 31). Für die Lymphozyten von weiblichen Lymphozytenspendern gab es eine solche Korrelation nicht. Alle übrigen Bindungsparameter (insbesondere auch die K_a und der spezifische Bindungsanteil) waren nicht altersabhängig.

Die MBK für hGH an Lymphozyten von gesunden, männlichen Blutspendern hängt vom Alter der männlichen Probanden ab: Sie nimmt mit zunehmendem Alter zu.

5.1.3. Geschlechtsabhängigkeit

Die Bindung von Proteohormonen an verschiedenen Rezeptorsystemen ist vom Geschlecht (21, 178, 246) und vom hormonellen Status (84, 159, 302) der Versuchstiere, von denen Rezeptor-tragendes Gewebe gewonnen wird, abhängig. Eine Geschlechtsabhängigkeit einzelner hGH-Bindungsparameter könnte die hohen Variabilitätskoeffizienten derselben (Kap. 5.1.1.) erklären.

In der Tat wiesen weibliche Lymphozytenspender an ihren Zellen signifikant höhere Bindungswerte (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) auf als männliche Probanden. Die höhere Bindung ist auf eine höhere MBK, d.h. auf eine größere Zahl an Rezeptoren pro Zelle, zurückzuführen (Tab. 32).

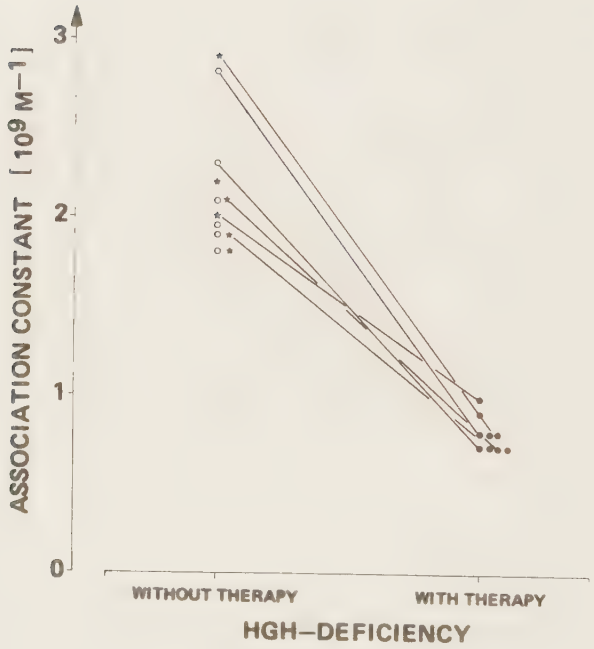


Abb. 30 ^{125}J-hGH-BINDUNG AN LYMPHOZYTEN VON PATIENTEN MIT HYPOPHYSÄREM MINDERWUCHS: VOR UND NACH THERAPIE MIT hGH. Berechnete Werte von Dreifachassays. Ordinate: Assoziationskonstante in [10^9 x M^{-1}]. Sechs Patienten wurden unter Therapie und nach drei Wochen Therapiepause untersucht (mit Geraden verbundene Symbole). ○ : Patientinnen, ✳ : Patienten.

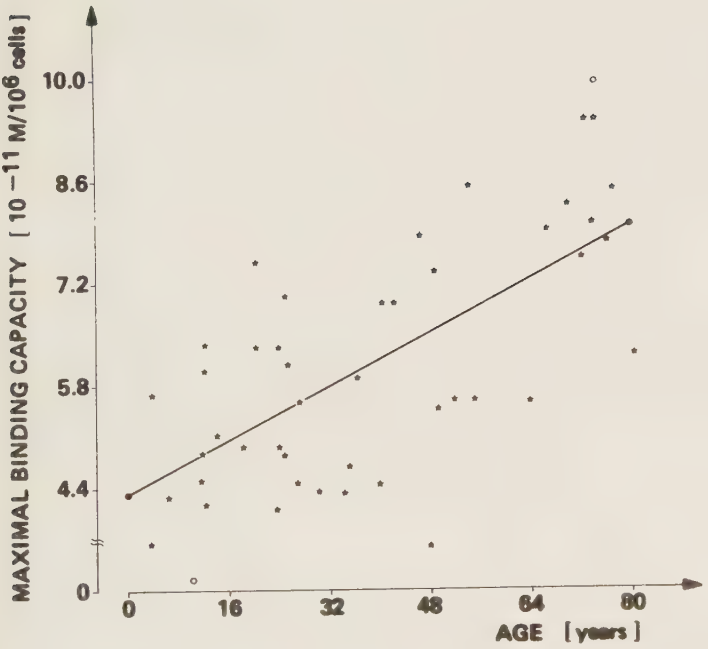


Abb. 31 ^{125}J-hGH-BINDUNG AN LYMPHOZYTEN. KORRELATION DER MBK MIT DEM ALTER GESUNDER MÄNNLICHER LYMPHOZYTEN-SPENDER. Abszisse: Alter in [Jahren]. Ordinate: MBK in [10^{-11} M/10^6 Zellen]. N = 44, R = 0.67, $p < 0.001$. Eingezeichnet ist die Regressionsgerade Y nach X, die Verbindung der beiden Kreise ergibt die Regressionsgerade X nach Y.

Zwar unterschieden sich die Gruppen 'weiblich' - 'männlich' auch hinsichtlich ihres Alters signifikant, jedoch war die Altersabhängigkeit der MBK bei männlichen Lymphozytenspendern der Geschlechtsabhängigkeit entgegengesetzt: Das Durchschnittsalter der männlichen Probanden lag ca. 10 Jahre über dem der Frauen und, obwohl die MBK mit dem Alter der männlichen Spender zunimmt, war die MBK an 'weiblichen' Lymphozyten signifikant höher als an Zellen von männlichen Blutspendern. - Im Gegensatz zur MBK zeigte die K_a des Rezeptors keine Geschlechtsabhängigkeit.

Somit sind die hohen VKs bestimmter Bindungsparameter an Lymphozyten gesunder Probanden auf die Geschlechtsabhängigkeit und Altersabhängigkeit der hGH-Bindung zurückzuführen. Die MBK an Lymphozyten gesunder, männlicher Probanden ist signifikant niedriger als die MBK für hGH an Lymphozyten weiblicher Spender. Mit dem Alter wird dieser Unterschied geringer, bzw. verschwindet ganz, da mit dem Alter männlicher Lymphozytenspender die Rezeptorenzahl pro Zelle ansteigt (siehe Kap. 6.5.).

5.2.1. Patienten

Proteohormonbindungen an verschiedenen tierischen und menschlichen Geweben scheinen vom Funktionszustand des Rezeptors, von in vivo zirkulierenden Hormonen und von in Lösung oder an der Zellmembran vorhandenen Enzymsystemen abzuhängen (Kap. 4). In vivo sind Rezeptorveränderungen für Proteohormone bei verschiedenen endokrinen Krankheitsbildern (7, 8, 14, 21, 22, 28, 69, 89, 95, 114, 115, 117, 142, 167, 168, 179, 220, 236, 262, 284), bei Erkrankungen der Leber (56), in der Schwangerschaft und während der Laktation (84, 159, 178, 302) sowie während Hungerperioden (205, 213) untersucht worden.

Die meisten Studien beschäftigen sich dabei mit Veränderungen des Insulinrezeptors in verschiedenen Tiermodellen. Dagegen ist die hGH-Bindung an Lymphozyten verschiedener Patientengruppen bisher nur von einer Arbeitsgruppe untersucht worden (117), obwohl sich der Lymphozytenrezeptor hervorragend für solche Studien eignet (Kap. 1.3.). Hinweise auf isolierte und kombinierte Hormonrezeptordefekte und Anti-Rezeptor-Antikörperbildung bei Autoimmunerkrankungen auch für hGH- und PRL-Rezeptoren (87, 109) unterstreichen die Bedeutung, die solche Studien in Zukunft erlangen können.

Lymphozyten von vier verschiedenen Patientengruppen wurden auf ihre Fähigkeit, hGH an ihrer Oberfläche zu binden, untersucht: Patienten mit Akromegalie, Patienten mit hypophysärem Minderwuchs mit und ohne Therapie (Substitution mit hGH) und Patienten mit ALL.

5.2.2. Akromegalie

Hohe zirkulierende Hormonspiegel in vivo scheinen eine Suppression von Hormonrezeptoren zur Folge zu haben: Dies scheint sowohl für Insulin (7, 142, 167, 236) als auch für hGH und SM (144, 262) zu gelten. Niedrige Hormonspiegel in vivo dagegen erhöhen die Hormonbindung in vitro (144, 179). Kontroverse Meinungen bestanden in der Literatur bislang über die Rolle des Panhypopituitarismus in der in vivo-Regulation von Hormonrezeptorsystemen: Der Ausfall der Hypophyse soll nach Meinung einiger Autoren zu allgemeinem Rezeptorverlust für Proteohormone führen (89, 125, 170, 179). Für den Lymphozytenrezeptor für hGH sind solche Bindungsveränderungen bisher nicht gefunden worden (117).

Lymphozyten von vier männlichen, akromegalen Patienten (Durchschnittsalter 52 Jahre; Range = 29 bis 65 Jahre) wurden untersucht. (Ein Patient der Medizinischen Klinik Innenstadt, Ziemßenstraße, der Universität München (Prof. Dr. med. K. von Werder), drei Patienten der Royal Victoria Infirmary, Newcastle-upon-Tyne (Dr. P. Kendall-Taylor)). Die MBK der Lymphozyten aller vier Patienten für hGH war sehr hoch (Tab. 31). Die Assoziationskonstanten variierten von $0.5 \times 10^9\ M^{-1}$ bis $3.6 \times 10^9\ M^{-1}$. Der Hormonstatus aller vier untersuchten Patienten war extrem akromegal: Die hGH-Spiegel im Glukose-Suppressionstest betrugen zwischen 90 und 110 ng/ml. Das klinische Erscheinungsbild der drei englischen Patienten war darüber hinaus ausgeprägt akromegal, während der Münchner Patient ein klinisch milderes Krankheitsbild zeigte.

Wenn auch keine signifikanten Unterschiede der hGH-Bindung an Lymphozyten zwischen diesen vier Patienten und gesunden Probanden bzw. gesunden, männlichen, altersentsprechenden Lymphozytenspendern bestanden, fällt die Höhe der MBK für hGH und der niedrige Anteil der spezifischen Bindung an der hGH-Gesamtbindung doch auf (Tab. 31). Um das Rezeptorverhalten von hGH an Lymphozyten akromegaler Patienten beurteilen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen mit Lymphozyten einer größeren Anzahl von Akromegalie-Patienten.

5.2.3. Hypophysärer Minderwuchs vor und nach Therapie

Lymphozyten von 15 Patienten mit Wachstumshormonmangel wurden auf ihre Fähigkeit, hGH zu binden, untersucht. (Patienten der Universitätskinderklinik, Lindwurmstraße, Universität München (Prof. Dr. med. O. Butenandt)). Von sechs Patienten wurden sowohl Lymphozyten, die während

Substitutionsbehandlung mit Wachstumshormon gewonnen worden waren, als auch Zellen, die nach drei Wochen Therapiepause separiert worden waren, im RRA auf ihre hGH-Bindung untersucht. Bei allen untherapierten Probanden lagen die hGH-Plasma-Spiegel auch im Stimulationstest (Clonidin-Test, Insulin-Belastungstest) unter 2 ng/ml. Bei Patienten unter hGH-Substitutionstherapie dürfen dagegen physiologische hGH-Plasma-Spiegel angenommen werden (48, 248).

Die Mittelwerte der K_as unterschieden sich in beiden Gruppen (therapierter GH-Mangel und nicht-therapierter GH-Mangel) signifikant von den K_a-Mittelwerten gesunder Lymphozytenspender (Abb. 32). Unter Therapie lag die K_a bei durchschnittlich $0.9 \times 10^9\ M^{-1}$, um ohne GH-Substitution auf $2.1 \times 10^9\ M^{-1}$ anzusteigen (Abb. 30).

Der Anstieg der Affinität des Lymphozytenrezeptors bei hGH-Mangel in vivo bedeutet eine Rezeptor-Selbstregulation über homologes Hormon. Der Affinitätsverlust unter Substitutionstherapie dagegen ist schwer zu erklären: Weder das Alter der Probanden, noch die Form des hGH-Substitutionsschemas, noch das Geschlecht der Patienten scheint bei dem beobachteten Bindungsverlust eine Rolle zu spielen. Unter Umständen führen kurzzeitige hGH-Konzentrationsspitzen nach der Applikation zu einer Down-Regulation des Rezeptors. Die gegenüber der MBK an Lymphozyten gesunder Probanden erhöhten MBK-Werte erwiesen sich nicht als signifikant höher. Untersuchungen an Lymphozyten einer größeren Anzahl von Patienten mit GH-Mangel werden auch hier zur Klärung offener Fragen führen.

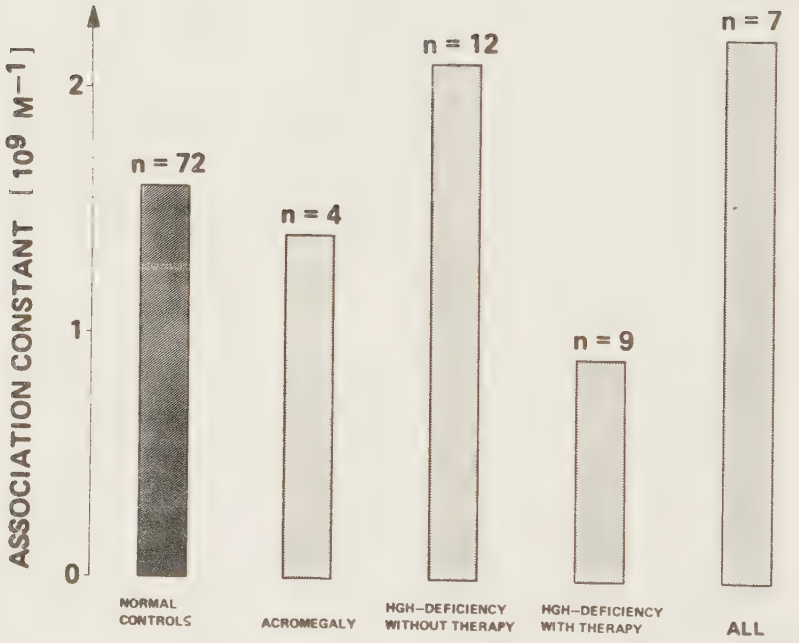


Abb. 32 ^{125}J-hGH-BINDUNG AN LYMPHOZYTEN VON PATIENTEN MIT VERSCHIEDENEN ERKRANKUNGEN. Berechnete Werte von Dreifachbestimmungen. Ordinate: Assoziationskonstante in [M^{-1}]. N = Zahl der Patienten. Signifikanzniveau im einseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: Akromegalie gegen Kontrollen: nicht signifikant $p > 0.05$. hGH-Mangel ohne Therapie gegen Kontrollen: $p = 0.0001$. hGH-Mangel mit Therapie gegen kontrollen: $p < 0.0001$. hGH-Mangel ohne Therapie gegen hGH-Mangel mit Therapie: $p < 0.0001$. ALL gegen Kontrollen: nicht signifikant $p > 0.05$.

5.3. ALL

In vitro Transformation von Lymphozyten führt zu veränderter Insulin- und GF-Bindung an diesen Zellen (13, 70, 95, 189). Geringe unspezifische GH-Bindungswerte an Lymphozyten werden nach PHA-induzierter Lymphoblastentransformation der Zellen verfünffacht (148). hGH selbst vermag andererseits eine Blastentransformation von Lymphozyten zu induzieren (182, 210) und die Proliferation von leukämischen Lymphoblasten auszulösen (83, 122, 210). Eine direkte Wirkung des hGH auf den Verlauf akuter lymphoblastischer Leukosen ist außerdem postuliert worden (259). Die Rezeptor-Bindung von hGH sollte deshalb an Zellen von Leukämie-Patienten mit hoher Zahl maligner Lymphoblasten im peripheren Blut untersucht werden.

Mononukleäre Zellen von sieben Kindern mit ALL (einmal T-cell type, fünfmal common type, einmal unklassifiziert) wurden im hGH-RRA eingesetzt (Patienten der Universitätskinderklinik, Lindwurmstraße, Universität München (Prof. Dr. med. R. Haas)). Alle sieben Patienten hatten hohe periphere Blastenzahlen im peripheren Blut (80-95% Blasten bei 15.000 bis 65.000 Leukozyten pro mm^3). Die Blasten wurden mittels der Ficoll-Separation aus peripherem Venenblut gewonnen (Kap. 9.1.2.1.1.). Die Separationspopulation bestand danach zu ca. 85% aus Lymphoblasten (panoptische Färbung nach Pappenheim).

Gleichermaßen hohe K_a und MBK für hGH kennzeichneten die Bindung von ^{125}J-hGH an diesen peripheren ALL-Lymphoblasten (Tab. 31). Der höchste überhaupt in allen Bindungsstudien gefundene Wert für die K_a für hGH fand sich in der ALL-Gruppe: 4.2×10^9 M^{-1}. Der spezifische Anteil an der Bindung betrug bis zu 78%. Die auffallenden Unterschiede zu Bindungswerten an Lymphozyten gesunder Probanden erwiesen sich im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test aller-

dings als nicht signifikant (Abb. 32). Es ist wichtig, die hGH-Bindung an Lymphoblasten einer größeren Zahl von ALL-Patienten zu untersuchen: Sind die hier gefundenen hohen Bindungswerte für ALL-Blasten typisch? Ist die hGH-Bindung direkt von der Größe der Blasten abhängig? Ist die hGH-Bindung Ausdruck eines bestimmten funktionellen Zustands dieser malignen Zellen?

6. Diskussion

6.1. Fragestellung

Die Bindung eines Proteohormons an Rezeptoren seines Zielgewebes geht jeder von diesem Hormon gesteuerten Stoffwechselaktivität voraus (71, 133, 230, 266). Hormonrezeptoren und entsprechende Äquivalente scheinen tatsächlich ubiquitär in allen Organismen vorzukommen, in denen Proteohormone und verwandte Botensubstanzen eine Rolle spielen (265). Mit der Entwicklung geeigneter Nachweisverfahren (36, 264) für Hormon-Rezeptor-Interaktionen gelingt es in zunehmendem Maße, Einblick zu gewinnen, auf welchem Wege Proteohormone ihre Wirkung entfalten. Erste klinisch bedeutsame 'Hormonrezeptordefekte' sind bereits beschrieben (109).

Rezeptoren für hGH sind bereits in einer ganzen Reihe von Geweben nachgewiesen worden (Tab. 3). Zwei Arbeitsgruppen beschrieben dabei auch die Bindung von GH an aus peripherem Venenblut des Menschen isolierten mononukleären Zellen (97, 117). Andere Autoren konnten an denselben Zellen allerdings keine spezifische Bindung von hGH finden (148).

In der vorliegenden Arbeit wird die spezifische Bindung von hGH an menschlichen Lymphozyten nachgewiesen. Eine einfache und praktikable (relativ geringer zeitlicher und apparativer Aufwand für einen Untersucher) Methode zum Nachweis der hGH-Rezeptoren an aus peripherem Venenblut des Menschen separierten Zellen wird beschrieben. Die für den hGH-Rezeptor an Lymphozyten berechneten Bindungsparameter liegen in der Größenordnung von in der Literatur beschriebenen Werten von Proteohormonbindungen an intakten Zellen. Sie liegen deutlich über den einzigen bisher in der Literatur berechneten Bindungsparametern von hGH

an Lymphozyten (97), allerdings sind die hier vorgestellten Bindungswerte am Lymphozyten erwartungsgemäß niedriger als Bindungswerte, die an isolierten Rezeptorsystemen (Plasmamembranen, Rezeptormoleküle) gewonnen wurden.

Die unterschiedlichen Ergebnisse von - mit dieser Arbeit nunmehr drei - verschiedenen hGH-Bindungsstudien mit Lymphozyten sind auf hauptsächlich zwei Faktoren, die in der vorliegenden Arbeit besonders berücksichtigt wurden, zurückzuführen:

Zum einen spielt die Auswahl des Assaysystems (Unterschiede zwischen Inkubationsmedium, Ionen-, Proteinkonzentrations- und Osmolaritätsunterschiede, Enzymkontaminationen) und der technischen Assaybedingungen (Schüttelwasserbad, konstante Temperaturbedingungen) eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung eines RRA (36, 196, 197, 264, 266). Tatsächlich wurde in Bindungsstudien, in denen keine spezifische hGH-Bindung an Lymphozyten nachgewiesen werden konnte (148), ein anderes Assaysystem mit einem anderen Puffer benutzt als in Studien mit nachgewiesener hGH-Bindung an mononukleären Zellen (97, 117; Kap. 2.1.).

Zum anderen konnten in der vorliegenden Arbeit Befunde aus der Literatur bestätigt werden, wonach mechanische Manipulation an Zellen während der Zellseparation und toxische Bestandteile bestimmter Separationsmedien (wozu auch Ficoll-Isopaque, das in der vorliegenden Arbeit zur Zellseparation benutzt wurde, gehört) die Bindung von Hormonen an lebenden Zellen behindern (89, 92, 211): Zur Expression einer spezifischen Bindung von hGH an Ficoll-separierten Zellen war es nötig, daß die Zellen vor der Durchführung des RRA bei 20°C für vier bis 16 Stunden in Assaypuffer ruhten. Eine Blastentransformation - gemessen als ^{3}H-TdR-Einbau (182) - wurde durch diese Re-Expressionsphase nicht induziert. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß geringfügige Veränderungen an

der Zellmembran wie etwa elektrostatische Alterationen (269) oder Fluktuationen zwischen Membran-Peptiden (72, 74) ausreichen, um spezifische Hormon-Rezeptor-Interaktionen zum Verschwinden zu bringen bzw. diese auch wieder zu re-exprimieren. Tatsächlich wurde in der Literatur diesem Phänomen an Lymphozyten nicht nachgegangen. Die unterschiedlichen Bindungsergebnisse lassen sich schon allein hierdurch völlig erklären.

Die Vorstellung vom ubiquitären Vorkommen von Proteohormonrezeptoren auch im menschlichen Organismus (109) erhält durch den in dieser Arbeit vorgestellten Nachweis von hGH-Rezeptoren an im peripheren Blut zirkulierenden Lymphozyten weitere experimentelle Unterstützung. Die Bedeutung methodischer Parameter in der Rezeptorforschung sind angesichts der Diskrepanzen in den Ergebnissen verschiedener Untersucher evident.

6.2. Methodik

Ein in der Rezeptorforschung bekanntes Puffersystem (196, 197, 264, 266; Kap. 2.1. und Kap. 9.1.1.1.) wurde in dieser Arbeit als Inkubationsmedium für den hGH-RRA verwendet. Sowohl die Homöostase des Puffersystems, d.h. die Abstimmung der einzelnen Komponenten aufeinander, als auch die Konzentrationen einzelner Pufferbestandteile scheinen darin maximale Hormonbindungswerte und optimale Bedingungen für die Durchführung von RRAs zu garantieren.

Wie für die Bindung von ACTH an Nebennierengewebe (195) scheint der Zusatz von Calcium-Ionen zum Inkubationsmedium für die Bindung von hGH an menschlichen Lymphozyten inhibierend zu wirken: K_a und MBK des hGH-Rezeptors

nehmen mit zunehmender Calciumkonzentration im Assaymedium kontinuierlich ab (Kap. 3.4.1.). Da Calcium auf Zellmembranebene verschiedene Wirkungen entfalten kann (71, 77, 89, 91, 255), verdeutlicht dieser Befund, wie stark der hGH-Rezeptor an bestimmte Membrankonstellationen am Lymphozyten gebunden sein muß. Im Gegensatz zu Calcium-Ionen scheinen Magnesium-Ionen nicht nur inhibierende Wirkung auf die hGH-Bindung an Lymphozyten zu haben (Kap. 3.4.1.). Abhängigkeit der Hormonbindung von bestimmten Magnesiumkonzentrationen sind dabei bereits für hGH-, Insulin- und TSH-Rezeptoren in Leber- und Schilddrüsengewebe bekannt (56, 216).

'Physiologische' Natriumionenkonzentrationen im Inkubationsmedium ergeben maximale hGH-Bindungswerte an mononukleären Zellen des Menschen. Geringe Abweichungen von isotonen NaCl-Konzentrationen vermindern die Affinität des Lymphozyten-Rezeptors für hGH. Die hier für den Lymphozyten-Rezeptor beschriebene Natrium-Abhängigkeit der Hormonbindung ist bereits für GH- und Insulin-Rezeptoren an menschlicher Leber (56) und an Rattenfettzellen (75) beschrieben worden. An Lymphoblastenlinien menschlicher Herkunft (IM-9-Zellen) ist dagegen keine Abhängigkeit der hGH-Bindung von der Natriumionenkonzentration gefunden worden (196, 197). Da an diesen Zellen nur 3-4% der eingesetzten Radioaktivität (^{125}J-hGH) an den Zellen binden (196), darf angenommen werden, daß in den erwähnten Studien im submaximalen Bereich des hGH-Rezeptors gearbeitet wurde und entsprechende Befunde nur bedingt mit den in dieser Arbeit vorgestellten Bindungsergebnissen verglichen werden können.

Überraschenderweise war in den hier beschriebenen RRAs die hGH-Bindung an Lymphozyten weder von der Kaliumionenkonzentration noch vom pH-Wert des Inkubationsmediums abhängig. Dieser Befund steht im Gegensatz zur Kalium- und

pH-Wert-Abhängigkeit anderer zellulärer Rezeptorsysteme für Proteohormone (56, 75, 120, 129, 194, 204, 216, 236).

Die selektive Wirkung einiger Kationen (Magnesium, Calcium, Natrium) auf die Bindung von hGH an die Oberfläche von menschlichen Lymphozyten und das Fehlen einer solchen Wirkung bei Kaliumkonzentrations- und pH-Wert-Änderungen im Medium lassen auf spezifische Membranveränderungen schließen, die durch einige Ionen induziert werden und zu einer entsprechenden Alteration des hGH-Rezeptors an intakten Zellen führen.

Hohe Inkubationstemperaturen (über 30°C) können durch Hormondegradation und hohe Dissoziationsraten zu niedrigen Hormonbindungswerten an Rezeptoren führen (135, 199, 301). Der Vorteil hoher Inkubationstemperaturen dagegen sind eine maximale Bindungsausbeute und die Tatsache, daß unter physiologischen Bedingungen (Körpertemperatur) gearbeitet wird. Niedrige Inkubationstemperaturen (unter 37°C) ergeben verminderte maximale Bindungswerte (159, 161, 221, 239, 266). Vorteilhaft ist bei RRAs in niedrigen Inkubationstemperaturen, daß nur mit geringer Hormondegradation gerechnet zu werden braucht, und ein Gleichgewicht zwischen Hormonbindung und Hormondissoziation einfach zu erreichen ist (169, 181).

Die in der Literatur dementsprechend herrschende Kontroverse zwischen Befürworten hoher, physiologischer Inkubationstemperaturen für RRAs und ihren Kritikern konnte mit dem hier gezeigten hGH-Rezeptorsystem an Lymphozyten umgangen werden: Rezeptordegradation und Hormondissoziation sind bei den angewandten Inkubationszeiten vernachlässigbar (Kap. 2.5.). Ein Gleichgewichtszustand (vgl. Kap. 3.3.2.) war am Lymphozytenrezeptor bei 37°C nach 90 Minuten erreicht. Die Inkubationszeit von 120 Minuten garantiert darüber hinaus bei 37°C maximale Bindungswerte.

In den hier gezeigten Bindungskinetiken wird deutlich, daß die Bindung von hGH an Lymphozyten ein temperaturabhängiger Prozeß ist. Energieverbrauchende Vorgänge sind damit an der Bindung beteiligt, eine Tatsache, die auch für hGH-Rezeptoren an Lymphoblasten Gültigkeit besitzt (98, 150, 164, 197). Da außerdem gezeigt werden konnte, daß die hGH-Bindung an Lymphozyten an die Lebendigkeit der Zellen (Kap. 2.3.) und an die Intaktheit der Lymphozytenoberfläche (Kap. 2.6.) gebunden ist, ist die hGH-Rezeptor-Interaktion als ein hochempfindlicher Prozeß zu werten, der Ausdruck und Bestandteil einer intakten Zellfunktion ist.

Dieser Auffassung und den theoretischen Anforderungen, die an ein Rezeptorsystem zu stellen sind, daß nämlich durch die Ligandbindung ein biologischer Prozeß in Gang gesetzt werden soll (siehe Rezeptordefinition Kap. 1.3.), kommt ein parallel zu dieser Arbeit untersuchtes Phänomen entgegen (182): hGH ist danach offensichtlich in der Lage, in vitro periphere mononukleäre Zellen zur Proliferation zu induzieren (Mitogenwirkung des GH). Darüber hinaus vermag nach diesen Untersuchungen hGH die Mitogen-induzierte Blastentransformation peripherer Lymphozyten des Menschen in vitro zu modulieren. Sowohl die modulierende als auch die Proliferations-induzierende Wirkung des hGH tritt dabei erst nach einer 'Ruhephase' der Zellen nach der Zellseparation auf. Diese 'Ruhephase' scheint der Re-Expressionszeit (Kap. 2.6.) der hGH-Rezeptoren an Lymphozyten zu entsprechen. Es darf somit postuliert werden, daß die in dieser Arbeit nachgewiesenen Bindungsstellen für hGH an peripheren mononukleären Zellen als Rezeptoren aufzufassen sind, da der Ligandbindung offensichtlich eine bisher nicht bekannte biologische Wirkung (Lymphoproliferation bzw. Modulation der Lymphoproliferation) folgt.

Mittels der in dieser Arbeit vorgestellten Methoden ist es möglich, hGH-Rezeptoren an zirkulierenden Blutzellen zu untersuchen. Erste Versuche (Daten nicht gezeigt), mittels des beschriebenen RRA hGH-Spiegel in menschlichem Serum zu bestimmen, waren dagegen nicht erfolgreich. Unspezifische Interferenzen (Kap. 3.6.) und Enzymgehalt der Serumproben (Kap. 4.4.3.) sind dabei in der Lage, Bindungswerte zu überlagern. In der Literatur werden solche Überlagerungen auch an anderen Rezeptorsystemen beschrieben (247). Einfache Reinigungsschritte zur isolierten Untersuchung hGH-haltiger Serumfraktionen sind aber in der Lage, die beschriebenen Schwierigkeiten zu beseitigen (199, 247). Für die Nutzung des hier vorgestellten RRA für klinische hGH-Serumbestimmungen wäre eine Serumfraktionierung somit unter Umständen ausreichend. In der vorliegenden Arbeit wurde darauf verzichtet, entsprechende Untersuchungen durchzuführen, da die Fragestellung der Existenz und Charakterisierung des hGH-Rezeptors selbst galt.

6.3. Rezeptorcharakterisierung

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode zum Nachweis von hGH-Rezeptoren an peripheren menschlichen Lymphozyten ermöglichte es, genauere Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Rezeptoren durchzuführen. Dabei ist, wie an anderer Stelle gezeigt werden konnte (182), die Bezeichnung 'Rezeptor' für die hGH-Bindungsstellen an Lymphozyten korrekt, da eine biologische Wirksamkeit des Hormons an diesen Zellen in Verbindung mit dem Hormonbindungsverhalten zu bringen ist.

Eine Reihe von Charakteristika (59, 77, 140, 230, 257, 266, 307), die bei jeder Hormon-Rezeptor-Interaktion zu beobachten sind, die aber quantitativ je nach untersuchtem Hormon und je nach getestetem Rezeptorsystem sehr variieren, wurde untersucht:

Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung von hGH an Lymphozyten ein endlicher Prozeß ist, der von der Ligand- und von der Rezeptorkonzentration direkt abhängig ist. Sättigbarkeit (siehe Kap. 3.2.) und Zellzahlabhängigkeit (= Abhängigkeit von der eingesetzten Rezeptorquantität) (Kap. 2.2.) sind damit belegt. Ein weiteres Charakteristikum jeder Hormon-Rezeptor-Interaktion, die Reversibilität (= kompetitive Verdrängbarkeit im Assay) wurde ebenfalls an Lymphozyten für die hGH-Bindung gefunden und wird in Kap. 3.9. ausführlich diskutiert.

Unterschiedliche Muster der Temperatur-, pH- und Ionenabhängigkeit der hGH-Bindung an verschiedenen menschlichen und tierischen Geweben sind beschrieben (20, 54, 56, 61, 92, 97, 99, 102, 108, 120, 125, 130, 133, 145, 150, 178, 197, 217, 240, 241, 303, 307). Die Variationsbreite der unterschiedlichen Befunde ist dabei sehr groß: Die Tatsache, daß an demselben Gewebe von einer Arbeitsgruppe zum Beispiel eine Abhängigkeit der hGH-Bindung vom pH-Wert des Inkubationsmediums (77) gefunden wird, von anderen Autoren aber keine solche Abhängigkeit festgestellt wird (143), zeigt, wie stark solche Membraneffekte von der angewandten Rezeptornachweismethode abhängig sind (siehe Kap. 6.2.). Distinkte Effekte von einzelnen Ionensystemen sind somit Ausdruck von Membranveränderungen, die vom Inkubationssystem zugelassen werden. Fehlende Effekte aber dürfen nicht als fehlende in-vitro-Wirkung des entsprechenden Ions gewertet werden.

Die Bindung eines Hormons an einen Gewebsrezeptor muß sich im Meßsystem in für das Hormon physiologischen Bereichen (Serumhormonspiegel, Circadianrhythmik, Stimulations-, Suppressionstests) quantifizieren lassen. Erst dann ist die Bindung als für in vivo-Prozesse relevant anzusehen (77, 86). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß der hGH-Rezeptor an Lymphozyten ein sensitives Bindungssystem darstellt, das im Verdrängungsassay noch auf 3 ng hGH anspricht. In der Literatur beschriebene RRAs mit Laborzellinien weisen eine ähnliche Sensitivität auf (196, 197). Kaninchenmammamembranrezeptoren sprechen auf 5 ng/ml an (278), Kaninchenlebermembranrezeptoren auf 2 ng/ml (114), Rattenleberzellen auf 1.0-1.5 ng/ml (120), Kaninchenleberplasmamembranen auf 0.2 ng/ml (116) und Lymphozyten (117) auf 5-10 ng/ml hGH.

Die wichtigsten mathematischen Größen, die eine Hormon-Rezeptor-Interaktion charakterisieren, sind die Assoziationskonstante und die maximale Bindungskapazität des Rezeptors (76, 178, 275). In dieser Arbeit wurde an einem Kollektiv gesunder Lymphozytenspender für die hGH-Bindung im Lymphozyten-RRA eine K_a von $1.5 \times 10^9\ M^{-1}$ und eine MBK von 7.1×10^{-11} M/10^6 Zellen gefunden. Diese Werte liegen über Werten, die an Lymphoblasten gefunden wurden: $K_a = 1.3 \times 10^9\ M^{-1}$, MBK = 4.0×10^{-11} M/10^6 Zellen (196, 197) und ergänzen in der Literatur beschriebene Bindungswerte für hGH an verschiedenen Geweben: Rattenlebermembranen (61): $K_a = 2.3 \times 10^9\ M^{-1}$ (20): $5.6 \times 10^9\ M^{-1}$, (144): $0.9 \times 10^9\ M^{-1}$, Kaninchenlebermembranen (54): $1.9 \times 10^9\ M^{-1}$ und (309): $3.0 \times 10^9\ M^{-1}$, Rattenfettzellen (120): $K_a = 1.0 \times 10^9\ M^{-1}$ und Bindungskapazität: 15.0×10^{-11} M/10^6 Zellen und Rattenleberzellen (246): MBK = 6.2×10^{-11} M/10^6 Zellen. Die mathematischen Größen, die die hGH-Rezeptor-Reaktion beschreiben, scheinen sich somit in verschiedenen Spezies und verschiedenen Organen kaum zu unterscheiden.

Die Heterogenität der verschiedenen sezernierten und zirkulierenden Proteohormone ist bekannt (30, 110, 127, 226, 289). Die Rolle der einzelnen Hormonformen im Organismus ist dagegen noch nicht geklärt (27). Spezifische Rezeptoren für Big- (124, 128, 247) und für Little-hGH (127, 128, 130, 217, 247) werden in der Literatur postuliert. An Lymphozyten scheint Big-Hormon ebenfalls einen Rezeptor zu besitzen (siehe Kap. 2.4.2.), allerdings ist die Big-Hormon-Bindung zu einem beträchtlichen Teil auf Konversion des Big-Moleküls zu Little-Hormon zurückzuführen. Es wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen, daß wahrscheinlich auch das Little-hGH selbst aus Hormonfraktionen unterschiedlicher Rezeptoraffinität besteht (Kap. 2.4.3.). Die hohe Affinität des über Lymphozyten-Bindung gereinigten Little-hGH-Tracers zum Lymphozytenrezeptor ist dabei nicht über bloße Reinigung von Proteinkontaminationen zu erklären, da eine zweite Little-hGH-Fraktion, die über Leberplasmamembranen des Kaninchens gereinigt worden war (Kap. 2.4.3.), geringere Spezifität und Affinität im Lymphozytenassay zeigte als ungereinigter Little-Tracer. Es kann somit vermutet werden, daß sich durch die Heterogenität des hGH-Moleküls in der Zirkulation eine entsprechende Heterogenität der zu den einzelnen GH-Formen gehörenden Rezeptoren an verschiedenen Geweben findet. Für die Stoffwechselaktivität des hGH in unterschiedlichen Geweben wäre so hypothetisch ein bestimmtes Rezeptormuster im jeweiligen Zielgewebe anzunehmen. Die molekulare Heterogenität der Proteohormone wäre demnach als ein Teil ihrer funktionellen Heterogenität aufzufassen.

Ausgehend von der hier beschriebenen Hypothese der Rezeptorheterogenität und den in der Literatur beschriebenen Problemen bei der Identifikation der Insulin-bindenden im peripheren Venenblut zirkulierenden Zellen (14, 95, 221, 275) ist es wichtig, zu untersuchen, welche Zellart für

die in der vorliegenden Arbeit beschriebene hGH-Bindung an peripheren mononukleären Zellen verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, daß im Gegensatz zu Insulin (14, 275) hGH an Lymphozyten gebunden wird (Kap. 3.8.2.). Andere nicht-mononukleäre Zellen des peripheren Venenbluts weisen keine mit dem hier vorgestellten RRA-Prinzip nachweisbare spezifische hGH-Bindung auf (Kap. 3.8.1.).

Die weitere Identifikation der hGH-bindenden Zelle bereitet methodische Schwierigkeiten: Die Auftrennung von Lymphozytensubpopulationen erfolgt entweder über cytotoxische Medien oder über die Membranintegrität möglicherweise störende Adhärenzschritte (11, 12, 175, 251, 295). Dementsprechend berichten Olefsky und Reaven (229), daß an über Nylonadhärenz isolierten T-Lymphozyten keine Insulinbindung festzustellen ist. Im Gegensatz zu diesem Befund band hGH in ersten Versuchen an T-Zellen hochspezifisch. Weitere Reinigungsschritte der Zellfraktionen brachten die Hormonbindung allerdings zum Verschwinden (Kap. 3.8.4.). Die Identifizierung der hGH-bindenden Zellen sollte deshalb nach der Bindung von hGH vorgenommen werden: Quantitative Bestimmung der Rezeptorzahl mit gleichzeitiger morphologischer Charakterisierung der maximal bindenden Zellen sind aber nur mit immunhistochemischen und fluoreszenzmikroskopischen Methoden möglich (98, 183). Solche Methoden sollten deshalb in der Zukunft auf hGH-Rezeptor-Studien an Lymphozyten angewandt werden.

6.4. Rezeptorregulation und Rezeptormodulation

Nach Kahn (171) befindet sich das Regulationszentrum, das die Stoffwechselantwort eines Zielgewebes auf einen hormonellen Reiz reguliert, am Rezeptor. Der Rezeptor ist also nicht nur die Stelle, an der jede Hormonaktion eingeleitet wird (71, 133, 230, 266), sondern auch das primäre Zentrum der Stoffwechselregulation (244).

Drei Regulationsprinzipien lassen sich dabei unterscheiden: Erstens vermag der Rezeptor und/oder der Hormon-Rezeptor-Komplex in unterschiedlichem Ausmaß internalisiert d.h. in die Effektorzelle aufgenommen zu werden (68, 91, 132, 163, 244). Mikroinvaginationen, Endozytose und Transport im Golgi-Apparat sind für die Internalisierung verantwortlich gemacht worden (108, 133, 149). Zweitens führen Veränderungen an der Zellmembran und an den Membranmolekülen selbst zu verändertem Rezeptorverhalten der Membran. 'Patching', 'Capping', Konformationsänderungen, Alterationen der Lipid-Protein-Ratio der Zellmembran können Einfluß auf die Hormonbindung gewinnen (58, 91, 108, 131, 189, 274). Drittens ist möglicherweise der intrazelluläre Umsatz des Hormons bzw. des internalisierten Hormon-Rezeptor-Komplexes rückwirkend für Rezeptor-Konformationsänderungen verantwortlich (58, 108, 183).

Ausdruck einer Rezeptorregulation und -modulation sind immer Änderungen der den Rezeptor charakterisierenden Bindungsparameter (Kap. 1.3. und Kap. 6.3.): So mag sich eine Rezeptorregulation in einer Affinitätsänderung (20, 108, 129, 170, 187, 300), einer Kapazitätsänderung (Ab- oder Zunahme der Rezeptorzahl pro Zelle etc.) (20, 90, 131, 147, 168, 198, 220, 244) oder in einer Änderung sowohl der K_a als auch der MBK ausdrücken (244, 294). Ein Anstieg der Rezeptordegradation und -dissoziation (59, 133, 149, 198, 211) sowie die Zunahme des 'unspezifischen' Bindungsanteils

(= irreversibler, d.h. nicht verdrängbarer Bindungsanteil) (58) können weiterhin als Zeichen einer Rezeptormodulation auftreten.

Prinzipiell sind Rezeptorregulationen durch direkten Zellkontakt, d.h. durch die Interaktion von Zellen an sich, oder durch Mediatoren und humorale Faktoren vermittelt vorstellbar. Für Hormonrezeptoren ist zunächst - nicht zuletzt auch wegen klinischer Fragestellungen - eine humorale Modulation der Ligandbindung in den Vordergrund zu stellen (294).

Vier Gruppen von möglichen 'Regulationsmediatoren' wurden in der vorliegenden Arbeit mittels des Lymphozyten-RRA für hGH getestet:
1. Mitogene, 2. Enzyme, 3. hGH selbst, 4. andere Hormone.

Verschiedene Arbeitsgruppen nahmen an, daß 'Kulturbedingungen' die an Kulturzellinien gegenüber zirkulierenden Zellen erhöhten Bindungswerte einiger Hormone verursachen (7, 116). Andere Untersucher fanden, daß Mitogene eine Zunahme (95, 189) bzw. Abnahme (13, 70) der Rezeptoraffinität in Zellkulturen bzw. in RRA-Systemen bewirken. An Lymphozytenrezeptoren für hGH wird in dieser Arbeit zum ersten Mal eine Mitogenbeeinflußbarkeit demonstriert: PHA erhöht die Bindung des GH schon nach kurzer Exposition und führt nach Blastentransformation zu einer starken Zunahme der Rezeptoren pro Zelle. Con A dagegen beeinflußt bei kurzer Expositionsdauer die Bindung nicht, reduziert nach Blastentransformation aber die Affinität des hGH-Rezeptors stark (Kap. 4.6.). PHA und Con A führen beide, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß zu Membranumbauprozessen (274). Die Mitogen-gesteuerte Bindungsmodulation an hGH-Rezeptoren an Lymphozyten vermag deshalb als Modell-Beispiel einer humoral ausgelösten Rezeptorregulation durch Zellmembranalteration zu dienen.

Eine ganze Reihe von Enzymen wurde auf ihre Wirkung auf Hormonrezeptoren und die Hormonbindung untersucht (60, 72-74, 91, 129, 176, 187, 197, 279, 318). Bisher war aber keine enzymatisch-modulierte Bindungsregulation an zirkulierenden Zellen untersucht und beschrieben. In der hier vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß Trypsin einerseits die Bindung von hGH reduziert, Antitrypsin-Aktivitäten aber nicht nur die Trypsin-Wirkung aufheben sondern darüber hinaus zu einem starken Anstieg der Rezeptoraffinität für hGH führen.

Die Wirkung des Trypsins ist durch die proteolytische Wirkung des Enzyms einfach zu erklären: Trypsin führt zur Proteolyse von Membranproteinen und damit auch der Rezeptormoleküle. Dagegen kann die bindungssteigernde Wirkung des Antitrypsins nicht hinreichend erklärt werden. Möglicherweise werden membranständige Enzymsysteme, die über die Internalisation des Hormon-Rezeptor-Komplexes eine 'Down-Regulation' des Rezeptors hervorrufen (134, 149), durch Antitrypsin blockiert.

Die Bedeutung einer solchen 'antitrypsin-modulierten' Hormonbindung ergibt sich aus dem ubiquitären Vorkommen von Enzym-inhibierenden Aktivitäten im Organismus. Somatomedin-B, das ebenfalls zu diesen Enzymhemmern gezählt werden kann (112, 138, 280, 308), wurde in kleinen Dosen auf seine Rezeptor-modulierende Potenz untersucht. Tatsächlich steigt die Affinität des hGH-Rezeptors nach SM-B-Exposition stark an. Es ist denkbar, daß SM über Rezeptor-Modulationen mögliche direkte Wirkungen des hGH reguliert (siehe Kap. 6.6. und Abb. 28). Da SM-B selbst eine gewisse GH-Abhängigkeit zeigt (138, 315), ist dies möglicherweise ein Weg der Up-Regulation des hGH-Rezeptors durch GH selbst.

Selbstregulation von Hormonrezeptoren durch das zu bindende Hormon ist ausführlich beschrieben. Dabei sollen hohe Hormonkonzentrationen im Inkubationsmedium zur Abnahme der

Hormonbindung führen ('Down-Regulation') (89, 131, 198). Auch das gegenteilige Phänomen, d.h. Anstieg der Hormonbindung bei Anwesenheit hoher Hormonspiegel (144) ist allerdings beschrieben worden (s.o.).

Am Lymphozyten-Rezeptor für hGH führte eine Vorinkubation mit hGH zu einem Dosis- und Zeit-abhängigen Abfall der Bindungswerte. Eine der 'Down-Regulation' an anderen Rezeptorsystemen entsprechende negative Feedback-Regulation des hGH-Rezeptors darf damit angenommen werden. Der Sinn einer solchen Selbstregulation könnte möglicherweise in der Verzögerung einer durch hohe Spitzen der Hormonsekretion hervorgerufenen Stoffwechselreaktion bzw. im Ausgleich überschießender Reaktionen liegen.

Östrogene (108, 144, 237, 246), PRL (108), Nebennierenrindenhormone (108) und Insulin (20) sollen die Bindung von hGH an seine Rezeptoren in vivo modulieren. Dexamethason und PRL waren am Lymphozytenrezeptor ohne Wirkung (Kap. 4.3.). Östradiol führte zum völligen Verschwinden der Bindung, während ACTH und vor allem Insulin die Bindung von hGH deutlich ansteigen ließen (Kap. 4.3.2.). Besonders die Wirkung von Insulin verdient Beachtung, da Insulin demnach an lebenden Zellen die Rezeptorbindung, und damit den ersten Schritt der Stoffwechselwirkung, seines partiellen Antagonisten GH verstärkt. Solche gegensinnigen Modulationen mögen zur Herstellung und Aufrechterhaltung der Homöostase innerhalb endokriner Regelkreise eine große Rolle spielen.

6.5. Klinische Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals mononukleäre Zellen einer größeren Gruppe von gesunden Lymphozytenspendern auf ihre Fähigkeit, hGH zu binden, untersucht. An den Lymphozyten aller Zellspender fanden sich signifikante hGH-Bindungswerte (Kap. 5.1.1.). Es ist deshalb erstmals berechtigt, die hGH-Bindung an Lymphozyten als nicht auf Zellen weniger Probanden beschränkt sondern ubiquitär vorkommend zu bezeichnen.

In der Fetalzeit sollen geringere Hormonbindungen an Lebergewebe zu messen sein als in späteren Lebensaltern (178). Altersabhängigkeit von Proteohormonbindungen scheinen generell für solche Bindungen charakteristisch zu sein (56, 64, 146, 215). Tatsächlich fand sich eine signifikante Korrelation der hGH-Bindung mit dem Alter gesunder männlicher Blutspender (Kap. 5.1.2.). Für weibliche Probanden war dagegen eine solche Korrelation nicht zu errechnen. Die relativ geringe Zahl von weiblichen Probanden mag hierfür verantwortlich sein. Eher aber scheint dieser Befund auf geschlechtsspezifische Unterschiede an den hGH-Rezeptoren hinzuweisen (Kap. 5.1.3.).

Es ist bekannt, daß das Geschlecht von Versuchstieren, von denen Zellen in RRAs eingesetzt werden, die Bindungswerte für Proteohormone stark beeinflußt (21, 178, 246): In der Regel zeigen Zellen von weiblichen Tieren in in-vitro-Versuchen höhere Bindungswerte als Zellen von männlichen Tieren. Weibliche Zellspender besaßen eine signifikant höhere Anzahl von hGH-Rezeptoren an Lymphozyten des peripheren Venenbluts als männliche Probanden (Kap. 5.1.3.). Dieser Unterschied verschwand mit dem Alter, da Männer mit steigendem Alter steigende Rezeptorzahlen an Lymphozyten besaßen. Im jungen Lebensalter besteht somit ein Geschlechtsunterschied hinsichtlich der hGH-Bindung an Lymphozyten.

Dieser Unterschied ist vielleicht damit zu erklären, daß im Y-Chromosom über ein Suppressorgen die genetische Codierung für den hGH-Rezeptor supprimiert wird. Unter Umständen zirkulieren bei Männern darüber hinaus noch unbekannte humorale Faktoren, die - im späteren Lebensalter kaum mehr vorhanden - in der Jugend eine Rezeptorsynthese verhindern. Vielleicht verursachen darüber hinaus altersabhängige Veränderungen im hormonellen Gleichgewicht des Organismus die altersabhängige Bindungsmodulation bei Männern (siehe Kap. 6.4.). Geschlechtsunterschiede der hGH-Bindung repräsentieren somit unter Umständen den klinischen Aspekt hormoneller Rezeptorregulation und sind in Zukunft teleologisch zu klären.

Laron berichtet, daß die hGH-Sekretion im höheren Lebensalter abnimmt und daß außerdem dieser Abfall der hGH-Sekretion auf verschiedene Stimuli bei Männern früher einsetzt als bei Frauen (192). Der Anstieg der hGH-Rezeptor-Bindung bei Männern mit dem Alter könnte somit durch Nachlassen einer Down-Regulation durch das Hormon selbst erklärt werden. - Bei Frauen kann eine Down-Regulation durch GH unter Umständen durch über Östrogen getriggerte Regulation oder andere unbekannte Regulationsmechanismen überspielt werden. -

Klinisches Pendant homolog-hormoneller Rezeptorregulation (Kap. 6.4.) ist der Einfluß des zirkulierenden hGH auf Bindungswerte an chronisch unterschiedlichen Hormonkonzentrationen exponierten Lymphozyten. In der Literatur sind keine Untersuchungen beschrieben, in denen signifikante Bindungsunterschiede für hGH zwischen Geweben von Patienten mit hohen hGH-Spiegeln und solchen mit niedrigen und nicht meßbaren gefunden worden sind. Nur eine Arbeitsgruppe (117) beschreibt eine solche Untersuchung an peripheren menschlichen Lymphozyten von Akromegalie- und Hypopituitarismus-Patienten, ohne Rezeptorunterschiede an die-

sen Zellen zu finden. Dagegen sind von zirkulierenden Hormonkonzentrationen abhängige Bindungswerte für Insulinrezeptoren mehrfach belegt (7, 142, 144, 167, 179, 236).

Die hGH-Bindung an Lymphozyten akromegaler Patienten unterschied sich in den hier demonstrierten Untersuchungen nicht signifikant von der Bindung des Hormons an Zellen gesunder Probanden. Leider ist die Aussagekraft dieser Untersuchungen durch die geringe Fallzahl sehr limitiert. Dieser Mangel haftete im übrigen auch der zitierten Studie an (117).

Dagegen erwiesen sich die auffälligen Unterschiede in der hGH-Bindung an Zellen minderwüchsiger Kinder mit und ohne Therapie sowohl gegeneinander getestet als auch gegenüber gesunden Kontrollkindern als signifikant verschieden. Interessant ist, daß die während des hGH-Mangels signifikant erhöhte K_a des hGH-Rezeptors unter Therapie bei allen untersuchten Kindern gegenüber Kontrollwerten auf signifikant erniedrigte Werte abfiel. Während die Erhöhung der Rezeptoraffinität in der Mangelsituation als Versuch des Organismus zu werten ist, die vorhandene (unzureichende) Hormonmenge maximal zu nutzen, so ist der Abfall der Affinität unter der Therapie unter Umständen ein Zeichen dafür, daß unter der Therapie unphysiologische Hormonspitzen in der Zirkulation vorkommen und zu einer Gegenregulation ('Down-Regulation') des Rezeptors führen. Eine andere Hypothese, die die 'Down-Regulation' zu erklären vermag, besteht darin, daß die Lymphozyten der hGH-Mangel-Patienten unter Substitutionstherapie mit gebundenem und internalisiertem hGH abgesättigt sind. Da der internalisierte GH-Anteil zumindest teilweise als irreversibel in die Zelle aufgenommen zu betrachten ist und die Internalisation zu Veränderungen am Rezeptor führen kann (68, 91, 132, 163, 244), wäre auch hier eine 'Down-Regulation' des Rezeptors (in vivo!) vorstellbar.

Es konnte somit zum erstenmal ein Einfluß des hGH-Status in vivo auf die Rezeptoraktivität von menschlichen Zellen in vitro gemessen werden. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zur Untersuchung von Lymphozyten-Rezeptoren eignet sich vorzüglich zu weiteren Studien über den 'Rezeptor-Zustand' eines Hormonzielgewebes bei verschiedenen Erkrankungen.

Eine direkte Wirkung von hGH auf den Verlauf von akuten lymphoblastischen Leukosen ist vermutet worden (259). Da hGH offensichtlich sowohl eine Blastentransformation von normalen menschlichen Lymphozyten induziert, als auch in vitro eine Proliferation leukämischer Lymphoblasten auszulösen vermag (83, 122, 182, 210), wurde untersucht, ob sich das Bindungsverhalten von hGH an leukämischen Lymphoblasten von der hGH-Bindung an Lymphozyten unterscheidet.

Bei einer Gruppe von sieben Patienten mit ALL war die hGH-Bindung an peripher zirkulierenden Lymphoblasten nicht signifikant verschieden von Bindungswerten an normalen Lymphozyten gesunder Probanden. Auch diese Aussage ist limitiert durch die geringe Fallzahl der untersuchten ALL-Patienten. Auffallend ist die hohe K_a an ALL-Lymphoblasten, die ihrer möglichen klinischen Bedeutung wegen an Lymphoblasten einer größeren Zahl von Patienten untersucht werden sollte.

6.6. Funktionelle Bedeutung des Rezeptors

In der molekularen Wirkkaskade jeder Hormonwirkung steht die Hormon-Rezeptor-Bindung an erster Stelle (71, 133, 230, 266). Damit kommt der Rezeptorfunktion eine zentrale Stellung in jeder Stoffwechselaktion zu: Ohne Hormonbindung erfolgt keine Aktivierung des Zellstoffwechsels, ohne diese ist eine Stoffwechselantwort des Organismus nicht denkbar.

Proteohormonrezeptoren kommen in allen Organismen vor (265). Verschiedene Organe eines Organismus weisen auffallende Ähnlichkeit hinsichtlich ihrer Rezeptorstrukturen auf (109). Dennoch sind organspezifische Rezeptormuster bekannt (58, 77, 109, 140, 266) und speziesspezifische Rezeptoren sind ausführlich beschrieben (196, 197, 266). Mikrounterschiede in der Rezeptorstruktur und weitreichende molekulare Rezeptorspezifität gehen möglicherweise mit der Heterogenität zirkulierender 'Proteohormon-Familien' einher und ermöglichen so eine Vielzahl von qualitativ und quantitativ unterschiedenen Hormonwirkungen.

Die Hormon-Rezeptor-Bindung ist nicht nur der erste Schritt der Hormonaktion sondern vielleicht auch der empfindlichste: Die Rezeptor-Bindung ist einer Vielzahl von humoralen und corpuskulären Einflüssen ausgesetzt (Kap. 6.4.) und wird von entsprechend vielen Faktoren moduliert. Circadiane und mittels verschiedenster Stimuli getriggerte (192) Schwankungen von Hormonspiegeln in vivo mögen so über Rezeptor-Gegenregulation geglättet und mikroreguliert werden. Diskrepanzen zwischen klinischem Bild bzw. Stoffwechselantwort und gemessener Hormonkonzentration (191) fänden ihre Lösung damit auf Rezeptorebene.

Die direkte Wirkung des GH auf das Organwachstum ist zwar belegt (53, 92, 93, 160, 162, 245), dennoch sind viele Autoren der Ansicht, daß hGH seine Wirkung vornehmlich über Somatomedine entfaltet (67, 81, 138, 191, 297). Erste Befunde dieser Arbeit, daß SM-B die Rezeptor-Bindung von hGH an Lymphozyten erhöht, lassen folgende Spekulation als erlaubt erscheinen (Abb. 28):

Von der Hypophyse sezerniertes GH, dessen Synthese und Sekretion vom Hypothalamus sowohl fördernde (GH-RF) als auch inhibierende (GH-IF) Impulse erhält, wirkt sowohl als 'tropes' Hormon als auch als direkt den Stoffwechsel betreffendes 'peripheres' Hormon. Die 'trope' Funktion besteht in der Induktion von Synthese und Sekretion der SM, die direkte Wirkung äußert sich als das Organwachstum initiierender und stimulierender Effekt. Beide Funktionen wiederum sind hypothetisch miteinander gekoppelt: SM-B erhöht die Sensitivität der Zielgewebe für hGH, das seinerseits seinen Rezeptor zu regulieren in der Lage ist. Direkte wachstumsfördernde Wirkung der SM-A und SM-C ergänzen diesen hypothetischen Wirkkreis.

Sich widersprechende Befunde aus der Literatur über direkte und indirekte Wirkung des hGH am Zielgewebe wären damit in Einklang zu bringen: Sowohl hGH als auch SM sind für die Wachstumsregulation verantwortlich. Der Rezeptor des Zielgewebes aber ist die Schaltstelle jeder dieser Wirkungen.

7. Zusammenfassung

Eine praktikable und sensitive (Nachweisgrenze 3 ng/ml hGH) Methode zum Nachweis und zur Untersuchung von hGH-Rezeptoren an peripheren menschlichen Lymphozyten wird vorgestellt. Im Standardassayansatz werden 1 x 10^6 Zellen 120 Minuten lang bei 37°C in einem geeigneten RRA-Medium mit radioaktiv markiertem hGH inkubiert. An die Lymphozyten gebundene Radioaktivität gilt als Gesamtbindungsgröße. Die Reversibilität der Bindung wird durch den Nachweis, daß stets mehr als 50% dieser Gesamtbindung kompetitiv durch Zugabe von nicht-markiertem GH verdrängt werden, bewiesen. Zur Expression der Hormonbindung ist eine Ruhephase der Zellen zwischen Zellseparation und RRA erforderlich.

Die Bindung von hGH an Lymphozyten des Menschen ist spezifisch und ist in der Lage, an diesen Zellen in vitro eine biologische Wirkung (Modulation der Lymphoproliferation) zu entfalten. Die Rezeptorbindung erreicht rasch ein Gleichgewicht (nach spätestens 90 Minuten Inkubationszeit), sie ist sättigbar und zu einem großen Teil reversibel. Temperaturabhängigkeit und Ionenabhängigkeit weisen auf einen energieverbrauchenden, an bestimmte Membranverhältnisse gebundenen Bindungsvorgang hin.

Der Nachweis von hGH-Rezeptoren an Lymphozyten ist präzise (VK = 7.8% im Intraassayvergleich) und reproduzierbar (VK = 10 % im Interassayvergleich). Das Vorkommen der GH-Rezeptoren scheint ubiquitär zu sein, an Lymphozyten von 72 gesunden Blutspendern ist eine typische GH-Bindung meßbar: Die K_a für die Bindung beträgt 1.5 x 10^9 M^{-1} (VK 14%), die MBK des Rezeptors war 7.1 x 10^{-11} M/10^6 Zellen (VK größer 20%). Die große Variationsbreite der MBK in einem Kollektiv gesunder Probanden erklärt sich aus der Ge-

schlechtsabhängigkeit und der Altersabhängigkeit der Bindung: Weibliche Probanden weisen an ihren Lymphozyten signifikant höhere MBK für hGH auf als männliche Blutspender, dieser Unterschied verschwindet in höheren Lebensaltern, da bei Männern die MBK mit dem Alter zunimmt.

Es kann als erwiesen gelten, daß Lymphozyten eher als Monozyten für die hGH-Bindung an mononukleären Blutzellen verantwortlich sind. Erste Befunde zur Identifikation der bindenden Zelle weisen auf T-Lymphozyten als GH-Rezeptor-tragendem Zelltyp hin.

Mitogen-induzierte, enzymatisch-verursachte und hormonell-auslösbare Veränderungen der Rezeptoraffinität und der Bindungskapazität wurden untersucht: PHA erhöht die Anzahl der Rezeptoren pro Zelle sowohl nach kurzer Exposition der Zelle als auch nach Blastentransformation. Con A dagegen führt nach Blastentransformation zu einem starken Affinitätsverlust des hGH-Rezeptors. Trypsin lysiert den Rezeptor, ein Vorgang, der durch Antitrypsin antagonisiert wird. Antitrypsin selbst vermag die Affinität des Lymphozytenrezeptors für hGH zu erhöhen. Der Mechanismus dieser Antitrypsinwirkung bleibt unbekannt. SM-B, ein GH-abhängiger Faktor mit Antitrypsinwirkung und -ähnlichkeit, verursacht ebenfalls einen Anstieg der K_a. Dieser Befund gab Anlaß dazu, eine neue Hypothese der Wachstumsregulation und -steuerung zu suchen: Danach gibt es eine direkte wachstumsfördernde Wirkung sowohl der GF als auch des GH. Die Wirkung des hGH wird dabei aber durch weitere Faktoren (z.B. SM-B) moduliert.

Erste Untersuchungen mit Lymphozyten von Patienten mit endokrinen Störungen (Akromegalie und hypophysärer Minderwuchs) und Erkrankungen des lymphopoetischen Systems ergaben Unterschiede gegenüber Zellen gesunder Kontrollpersonen in allen drei Gruppen: Nur die hGH-Bindungswerte an Zellen minderwüchsiger Patienten aber unterschieden sich signifikant von

den Kontrollwerten: Ohne hGH-Substitutionstherapie war die K_a des GH-Rezeptors erhöht, mit hGH-Substitution war die Affinität der Lymphozyten für hGH erniedrigt. Fehlende Signifikanz bei Akromegalie- und ALL-Patienten hinsichtlich unterschiedlicher GH-Bindungswerte mag allerdings auf die geringen Fallzahlen in diesen Gruppen zurückzuführen sein.

Es ist damit in dieser Arbeit erstmals gelungen, an im peripheren Venenblut zirkulierenden Lymphozyten ein hochspezifisches und hochaffines Rezeptorsystem für hGH nachzuweisen und dieses Bindungssystem näher zu charakterisieren. Ausführliche Untersuchungen möglicher die Bindung modulierender Faktoren zeigen, daß der Rezeptor eines Proteohormons sensible und zentrale Regulationsstelle der Hormonwirkung ist. Es ist mit dem beschriebenen RRA in idealer Weise möglich, das Rezeptorverhalten eines Hormonzielgewebes bei verschiedenen Probandengruppen zu untersuchen. Erste Befunde zu diesem Thema unterstreichen die klinische Bedeutung solcher Rezeptoruntersuchungen.

8. Summary

Human peripheral blood lymphocytes (PBL) were shown to have specific binding sites for hGH. Binding of hGH to the lymphocyte receptor was rapid and saturable. The ligand-receptor interaction was shown to be time- and temperature-dependent. Mean affinity constant for the hGH-receptor of lymphocytes obtained from 72 healthy volunteers was 1.5×10^{9} M^{-1}. Mean maximal binding capacity was found to be 7.2×10^{-11} $M/10^{6}$ cells. Maximal binding capacity correlated well with the age of healthy male blood donors. Lymphocytes which were obtained from female volunteers were shown to express a higher number of GH-receptors than did cells obtained from male probands. This difference disappeared in the old age.

hGH-binding to lymphocytes in acute lymphoblastic leukemia (seven children) and in acromegaly (four adults) was not significantly different from the binding of hormone to normal lymphocytes. However, there was a higher affinity constant in the leukemia group and a decreased affinity constant in the agromegaly group. The failure to demonstrate a significant difference might well be due to the small number of patients tested. On the other hand hGH-deficiency in 12 untreated children was responsible for a significant rise of the affinity constant, whereas hGH-therapy (nine children) lead to a sharp decrease of the affinity constant. These effects are thought to be due to regulatory mechanisms of the receptor induced by circulating hormone in vivo.

Regulation of receptor concentration and binding affinity in vitro was investigated intensively: Mitogens, enzymes, enzyme-inhibitors and different hormones were tested for their ability to modulate hGH-binding to PBL. PHA lead to a striking increase in the number of receptors per cell,

whereas Con A was able to reduce the affinity of the receptor after induction of lymphoproliferation. Trypsinated cells did not bind hGH. Addition of anti-trypsin to the cells completely abolished this effect. Anti-trypsin alone (1000 Kallikrein inhibiting units) increased the affinity constant threefold. This increase was assumed to be due to inhibition of membrane-associated proteinase-systems. Down-regulation and self-inhibition of the GH-receptor by hGH itself was demonstrated in a subset of experiments. Hormonal effects on the binding of GH to the lymphocyte surface included: Insulin- and ACTH-induced enhancement of binding and a sharp decrease of hGH-binding caused by oestradiol supplementation of the preincubation medium.

Somatomedin-B, which is known to be an effective trypsin-inhibitor, was also found to enhance hGH-binding to the lymphocyte receptor. From this finding a new hypothetical concept of growth regulation was developed: hGH was said to act directly on the target tissue, the receptor affinity of which is modulated by SM-B. Thus both the somatomedin-family and GH are thought to have a direct and an indirect role in growth regulation in vitro.

9. Anhang

9.1. Material und Methodik

9.1.1. Material

9.1.1.1. Puffer und Medien

Lymphozytenseparationsmedium	'Ficoll Isopaque', Flow Laboratories, Irvine, England
Medium TC-199	Flow Laboratories, Irvine, England
Phosphatpuffer, no 6003	Hypolab SA, Schweiz
RPMI-1640 mit 5% Humanserum,	Glutamin, Vitamin- und Antibiotikazusatz, Gibco, Detroit, USA
Assaypuffer (Lymphozyten-RRA)	25 mM Tris-HCl, pH 7.4, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, EDTA III 1 mM, Dextrose 10 mM, Na-Acetat 15 mM, BSA 1 mg/ml
Präparationspuffer	25 mM Tris-HCl, pH 7.4, $MgCl_2$ 1 M, 0.25 M Saccharose
Assaypuffer (Membran-RRA)	25 mM Tris-HCl, pH 7.6, $MgCl_2$ 25 mM, 0,02% NaN_3, BSA 1 mg/ml

9.1.1.2. Hormonpräparate und Enzyme

hGH	Grorm 4 ^{R}, Fa. Serono, Freiburg i.B. Crescormon^R, KabiVitrum, München[1] Nanormon^R, Nordisk Insulinlaboratorium, Dänemark Somatonorm^R, Fa. Kabi, Stockholm[1]

	Reference Preparation, National Institute for Biological Standards, Holly Hill, Hampstead England[2]
PRL	PRL-Standard, Fa. Serono, Freiburg i.B.
LH-FSH	Pergonal^{R}, Fa. Serono, Freiburg i.B.
TSH	TSH-Standard, Fa. Serono, Freiburg i.B.
ACTH	Acethropin^{R}, Fa. Hoechst, Frankfurt/Main
TRH	Relefact-TRH^{R}, Fa. Hoechst, Frankfurt/Main
LH-RH	Relefact-LH-RH^{R}, Fa. Hoechst, Frankfurt/Mai
Oxytozin	Syntocinon^{R}, Fa. Sandoz, Nürnberg
hCG	Predalon^{R}, Fa. Organon, Oberschleißheim
Insulin	Insulin S, Hoechst CS, Frankfurt/Main
Östradiol	Reinsubstanz, Fa. E.Merck, Darmstadt
SM-B	Präparation, Fa. KabiVitrum, Stockholm[3]
Anti-SM-B-Antiserum	Präparation, Fa. KabiVitrum, Stockholm[3]
Trypsin	Fa. Boehringer, Mannheim[4]
Anti-Trypsin	Trasylol^{R}, Fa. Bayer, Leverkusen
	Aprotinin^{R}, Fa. Boehringer, Mannheim[4]
DNAse	Präparation, Fa. Boehringer, Mannheim[5]

Indices:

1) Dankenswerterweise von Fa. Deutsche KabiVitrum, München, zur Verfügung gestellt.
2) Großzügigerweise von Dr. P. Kendall-Taylor, Royal Victoria Infirmary, University of Newcastle-upon-Tyne, England, überlassen.
3) Dankenswerterweise von Dr. L. Fryklund, Stockholm, geschenkt.
4) Freundlicherweise von Fa. Boehringer, Mannheim, zur Verfügung gestellt.
5) Freundlicherweise von Prof. Dr. med. U. Fink, I. Medizinische Klinik rechts der Isar, München, Abtlg. für Hämatologie und Onkologie, überlassen.

9.1.1. . Geräte

Kühlzentrifuge	RotoSilenta K, Fa. Hettich, BRD
Ultrazentrifuge	L5-50, Fa. Beckman, England
Gamma-Counter	BF 5300, Fa. Berthold, BRD
Beta-Counter	Liquid Scintillation 2450, Packard Tri-Carb, USA
Coulter Counter	Model FN, Coulter Electronics, Florida
Titertek Cell Harvester	Flow Laboratories, Irvine, England
Schüttelwasserbad	Fa. Köttermann, BRD
Sterile Arbeitsbank	Lamina Air Flow, Flow Laboratories, Irvine, England
Schüttelmixer	Cenco Instrumenten MIJ, Niederlande
Glashomogenizer	Dounce, England
Teflonhomogenizer	Braun, BRD
Fraktionssammler	Ultrovac 7000, LKB Bromma, England

9.1.2. Methodik

9.1.2.1. Zellseparationsmethoden

9.1.2.1.1. Lymphozytenseparation

Nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Venenblut von Erythrozyten und Granulozyten getrennt (42).

Unter sterilen Bedingungen werden fünf ml eines Lymphozytenseparationsmediums (Kap. 9.1.1.1.) mit fünf ml heparinisierten Venenblutes vorsichtig in 10 ml Plastikröhrchen überschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 1300 g und 4°C wird der Lymphozytenschleier (Abb. 33) mit einer sterilen Pasteurpipette vorsichtig abgehoben und in Assaypuffer (Kap. 9.1.1.1.) überführt. Anschließend wird 10 Min. lang bei 280 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert

und das Pellet in reichlich Assaypuffer resuspendiert. Dieser Waschvorgang wird noch einmal wiederholt, bevor die Zellen zur Elimination von Erythrozytenkontaminationen für 15 Min. in 0.83% NH_4Cl bei 30°C inkubiert werden. Weitere zwei Waschvorgänge werden angeschlossen.

Mittels Zellzählung im automatischen Coulter Counter (Kap. 9.1.1.3.) und lichtmikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer werden die Zellen auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt. Gleichzeitig wird nach jeder Zellseparation eine Trypanblaufärbung durchgeführt: 0.1 ml Zellsuspension werden mit 0.3 ml Trypanblaulösung (0.4%) versetzt und nach fünf Min. Inkubation bei 20°C unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Als lebend werden dabei Zellen definiert, die eindeutig nicht gefärbt sind (ca. 97% aller Lymphozyten nach der Zellseparation). Eine panoptische Färbung nach Pappenheim (24) wird vor Einsatz der Zellen im RRA durchgeführt, um den Anteil an Granulozyten (weniger als 5% pro Separation) und Monozyten (vier bis sechs Prozent pro Zellseparation) zu bestimmen.

9.1.2.1.2. Granulozyten- und Erythrozytenseparation

Zwei ml sechsprozentiges Dextran werden mit acht ml des Granulozyten-Erythrozyten-Pellets der Dichtegradientenzentrifugation (Abb. 33) (siehe Kap. 9.1.2.1.1.) gemischt. In leichter Schrägstellung werden die Zellen bei 37°C 30 Min. lang zur Sedimentation gebracht (4). Die im Überstand enthaltenen Granulozyten werden zentrifugiert und zweimal in Assaypuffer gewaschen (siehe Kap. 9.1.2.1.1.). Das Erythrozytenpellet wird in 10 ml Assaypuffer resuspendiert und ebenfalls zentrifugiert und zweimal gewaschen. Die Kontamination der so gewonnenen Zellpopulationen durch Monozyten und Lymphozyten liegt - differenziert in Pappenheim-Ausstrichen - unter fünf Prozent.

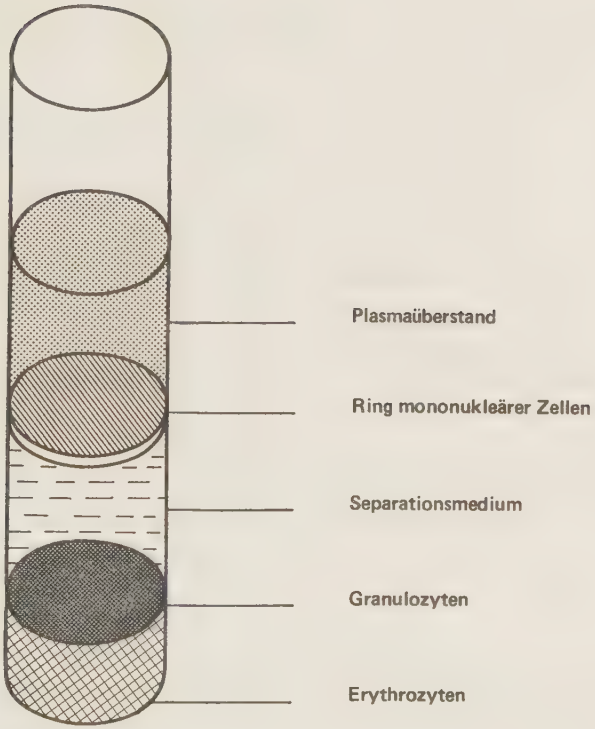


Abb. 33 Dichtegradienten-Separation nach Boyum. Zellfraktionen nach Zentrifugation

9.1.2.1.3. Monozytenseparation

Monozyten adhärieren an glatten Plastikoberflächen und lassen sich so mittels Adhäsion von anderen, nicht-adhärenten mononukleären Zellen trennen (31).

Mit Monozyten kontaminierte Lymphozyten der Lymphozytenseparation (Kap. 9.1.2.1.1.) werden in angereichertem RPMI-1640-Medium für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO_2 unter sterilen Bedingungen in Plastikschalen inkubiert. Danach wird der Überstand vorsichtig dekantiert, und die Schalen nach sechsmaligem Spülen mit Inkubationsmedium mit jeweils vier ml RPMI-1640-Medium, das mit 20% humanem O-Serum angereichert ist, 16 Stunden lang bei 37°C und 5% CO_2 unter sterilen Kautelen inkubiert. Der Überstand wird dann erneut verworfen (bzw. als monozytenfreie Lymphozytenpopulation im RRA eingesetzt), und die adhärenten Monozyten werden schließlich mit kaltem Medium von der Schalenwand abgespült. Nach Zentrifugation und zweimaligem Waschen in Assaypuffer werden die Zellen gezählt und in Assaypuffer eingestellt. Mehr als 90% der so gewonnenen Zellen lassen sich in der panoptischen Färbung nach Pappenheim als Monozyten identifizieren, bzw. sind laut Literatur (31) Naphthyl-Esterase-positiv.

Zwei der Monozytenseparationen wurden dankenswerterweise von Frau Anneliese Reichert (Hämatologisches Forschungslabor, I. Medizinische Klinik rechts der Isar, Abteilung für Hämatologie, München) durchgeführt.

9.1.2.1.4. T-Zellseparation

Fehlende Adhärenz an inerten Oberflächen (z.B. Nylon-Fasern) wird zur Separation von T-Lymphozyten benutzt (166).

Mononukleäre Zellen (Ficollseparation (Kap. 9.1.2.1.1.)) werden in angereichertem RPMI-1640-Medium in Nylonwolle eingewaschen. Nach Inkubation bei 37°C und 7% CO_2 für 45 Min. werden die Nylonsäulen mit Medium eluiert (= Nylon-I-Fraktion). Diese Zellen (60-85% T-Zellen) können in einem zweiten Säulenlauf weiter aufgetrennt werden (Eluat = Nylon-II-Fraktion) und repräsentieren dann eine zu 85-95% aus T-Zellen bestehende Zellpopulation.

Die Identifikation der T-Zellen erfolgt anschließend über den Nachweis der positiven Rosettenbildung mit Schafserythrozyten (165, 172). Mit AET beladene, gewaschene Hammelerythrozyten werden hierzu mit den zu testenden Lymphozyten inkubiert. Nach Färbung mit Methylenblau wird der Anteil rosettenbildender Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Die Nylonsäulenseparationen wurden dankenswerterweise von Herrn Helmut Holtmann (Immunologisches Labor, Universitätskinderklinik, Lindwurmstraße, München) durchgeführt.

9.1.2.1.5. Lymphoblastenkulturen

Erythroleukämiezellen K-562 und B-Zell-Lymphoblasten PDe-B-1 wurden freundlicherweise von Herrn Prof. W. Leibold (Institut und Poliklinik für Klinische Immunologie und Rheumatologie, Universität Erlangen) zur Verfügung gestellt und von Frau Maria De Tavera und Herrn Helmut Holtmann (Immunologisches Labor, Universitätskinderklinik, Lindwurmstraße, München) in Kultur gehalten.

PHA- und Con A-Blasten wurden durch vier- bzw. siebentägige Inkubation von Lymphozyten mit den entsprechenden Mitogenen bei 37°C und 5% CO_2 unter sterilen Kautelen in angereichertem RPMI-1640-Medium induziert. Zellproliferation wurde über ^{3}H-TdR-Einbau gemessen (182). Für die Rezeptorassays wurden alle Zellen nach Zentrifugation und zweimaligem Waschen in Assaypuffer überführt.

9.1.2.2. Hormonmarkierung

Sorgfältige Markierung des Tracerhormons mit niedriger spezifischer Aktivität ist erste Voraussetzung für den Aufbau von RIAs und RRAs (18, 100, 266). Zwei Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit für die Markierung von hGH benutzt: Die LPO-Methode als Routinemarkierung und die Chloramine-T-Methode als Kontroll- und Referenzmethode.

9.1.2.2.1. Laktoperoxidase

hGH-Markierungsstandard wird über mit LPO und H_2O_2 enzymatisch oxydiertes ^{125}J iodiniert. Das Reaktionsgemisch dieser Iodination wird über eine Sephadex-G-50-Säule und anschließend über eine Sephadex-G-75-Säule chromatographiert. Für die meisten Versuche wurde der Little-hGH-Anteil des Eluats, für einige Experimente zusätzlich der Big-hGH-Anteil verwendet (214, 298).

Alle LPO-Markierungen wurden dankenswerterweise von Frau Anita Buchner und Frau Lilian Bock (Endokrinologisches Labor, Medizinische Klinik Innenstadt, Ziemßenstraße, Universität München) durchgeführt.

9.1.2.2.2. Chloramine-T

Die Chloramine-T-Methode ist eine schnelle und einfache Methode, Proteine zu iodinieren (158). Eine gering modifizierte Chloramine-T-Methode (105) soll die biologische Aktivität der markierten Proteine weniger alterieren und kontinuierliche Markierungsmuster erzielen. Rechromatographie, Reinigung und Einstellung des Little-hGH entsprechen den bei der LPO-Methode angewandten Verfahren (Sephadex-Säulen).

Alle Iodogen-Markierungen wurden dankenswerterweise von Herrn John Taylor (Wellcome Laboratories, Endocrine Unit, Department of Medicine, Royal Victoria Infirmary, University of Newcastle-upon-Tyne) vorgenommen.

9.1.2.3. Lymphozyten-RRA

9.1.2.3.1. Prinzip

Es wird angenommen, daß sich radioaktiv markiertes hGH hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften an einem Rezeptor-tragenden Zielgewebe nicht von unmarkiertem Hormon unterscheidet (140, 156). Mit Hilfe eines Standardassayansatzes (Kap. 9.1.2.3.2.) mit verschiedenen Konzentrationen unmarkierten Hormons bei gleichbleibendem Einsatz von ^{125}J-hGH kann eine Verdrängungskurve erstellt werden: Radioaktives und unmarkiertes Hormon konkurrieren kompetitiv um den Rezeptor. Mit steigender Menge an unmarkiertem Hormon im Ansatz nimmt der Anteil an gebundenem, radioaktivem Hormon ab (36, 264). Aus der Verdrängungskurve lassen sich Bindungscharakteristika für das eingesetzte Hormon (Assoziationskonstante, Maximale Bindungskapazität, Zahl der Bindungsstellen pro Zelle, Spezifität der Bindung) errechnen (184, 257, 272).

9.1.2.3.2. Standardansatz

10^6 Zellen einer Lymphozytenseparation (Kap. 9.1.2.1.1.) werden vier bis acht Stunden nach der Zellseparation in 1.5 ml Plastikhütchen mit 100/ul ^{125}J-hGH, 100/ul unmarkiertem hGH oder 100/ul Assaypuffer bei 37°C für 120 Min. im Schüttelwasserbad unter ständigem starken Schütteln in Assaypuffer inkubiert (Tab. 34). Der Tracereinsatz beträgt

10.000-20.000 cpm (2-7 ng hGH mit einer spezifischen Aktivität von 40-60 nC/ng). Nach Zusatz von 0.5 ml eisgekühltem Assaypuffer werden die Hütchen 10 Min. bei 4°C und 280 g zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend über eine Wulf'sche Flasche sorgfältig abgesaugt und die im Pellet gebundene Radioaktivität im Gamma-Zähler gezählt (Abb. 34).

9.1.2.4. Plasmamembran-RRA

9.1.2.4.1. Membranpräparation

Leber oder Mamma eines schwangeren Kaninchens wird zum Ende der dritten Schwangerschaftswoche entnommen, zerkleinert und auf Trockeneis gelegt. Alle Präparationsschritte werden dann bei 4°C oder im Eisbad durchgeführt. Die Gewebsstücke werden in eiskalten Präparationspuffer eingerührt und mit einem Mixer zerkleinert. Der Gewebsbrei wird durch vierfach gelegte sterile Kompressen filtriert und das Filtrat mit einem Teflon-Homogenizer gepottert. Nach erneuter Filtration pottert man mit einem Glas-Homogenizer und zentrifugiert anschließend bei 4°C und 1500 rpm für 15 Min. Der Überstand wird aufgefangen, das Pellet verworfen. Erneute Zentrifugation (4°C, 13500 rpm, 30 Min.) ergibt einen Überstand, der bei 35000 rpm für 90 Min. ultrazentrifugiert wird. Das Pellet dieses Schritts wird in 40 ml Präparationspuffer ohne $MgCl_2$ gelöst und noch einmal bei 35000 rpm ultrazentrifugiert. Das in 5 ml Präparationspuffer gelöste Pellet wird noch einmal mit einem Glaspotter homogenisiert und dann fraktioniert eingefroren (43, 249). Die Eiweißkonzentration der Präparationen wurde nach der Biuret-Standardmethode bestimmt.

Für die Membranpräparationen wurden Geräte und Räumlichkeiten des Endokrinologischen Labors, Medizinische Klinik Innenstadt, Ziemßenstraße, Universität München (Prof. K. von Werder) benutzt.

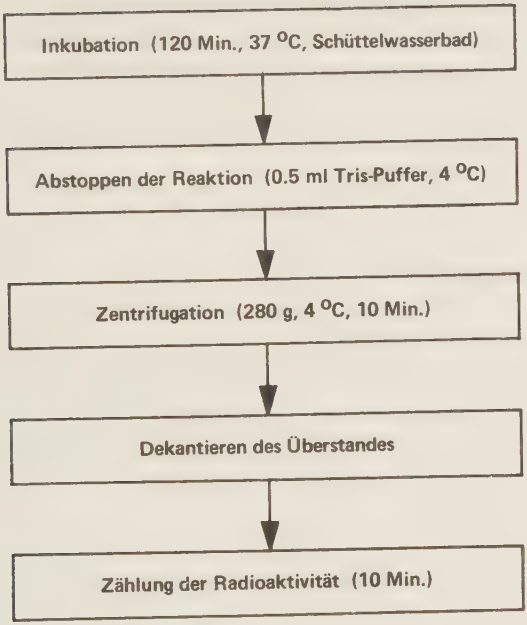


Abb. 34 Radiorezeptorassay - Bindungsversuch

9.1.2.4.2. Standardansatz

100/ul Membranassaypuffer, 100/ul hGH-Standard oder Assaypuffer, 100/ul Rezeptorpräparation und 100/ul ^{125}J-hGH werden drei Stunden lang bei 30°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wird mit 500/ul kalten Puffers (4°C) die Reaktion abgestoppt, bei 4000 rpm und 4°C für 60 Min. zentrifugiert, der Überstand sorgfältig abgehoben und die im Pellet gebundene Radioaktivität im Gamma-Counter gezählt (36, 107, 108, 238, 240).

9.1.2.5. Mathematische Methoden

Die Spezifität der Bindung, die Präzision und Reproduzierbarkeit des RRA (Intraassayabweichung, Interassayabweichung, Variationskoeffizienten), die Nachweisgrenze des RRA, Plausibilität und Richtigkeit der Assays wurden bestimmt (siehe Kap. 2, 3 und 4).

9.1.2.5.1. Scatchard Plots

Von allen Assayverdrängungskurven wurden mittels der von Scatchard (272) angegebenen Methode Rezeptoraffinität, MBK und die Anzahl der Bindungsstellen pro Zelle errechnet. Da Verdrängungskurven den graphischen Verlauf der Hormonbindung eher korrekt ausdrücken als Scatchard Graphs (184, 257), wurden in der Regel zusätzlich zu den errechneten Scatchard Daten die Verdrängungskurven graphisch dargestellt (siehe Abbildungen).

Alle Scatchard Plots wurden freundlicherweise von Frau I. Beranek (Datenverarbeitung SFB 51, Medizinische Klinik Innenstadt, Ziemßenstraße, Universität München) programmiert.

9.1.2.5.2. Statistische Methoden

Alle Probandengruppen wurden mittels des einseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Testes auf signifikante Unterschiede untereinander getestet. Alters- und Geschlechtskorrelationen der Hormonbindung wurden für alle Bindungsparameter in den Gruppen berechnet (268).

9.2. Literaturverzeichnis

1 Adams E.F., C.L.J. Winslow, K. Mashiter:
Pancreatic growth hormone releasing factor stimulates GH secretion by pituitary cells.
Lancet I, 1100 (1983)

2 Adamson E.D., M.J. Deller, J.B. Warshaw:
Functional epidermal growth factor receptors are present on mouse embryo tissue.
Nature 291, 656 (1981)

3 Aguilera G., D.S. Parker, K.J. Catt:
Characterization of somatostatin receptors in the rat adrenal glomerulosa zone.
Endocrinology 111, 1376 (1982)

4 Aiuti F.:
Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood.
Scand. J. Immunol. 3, 521 (1974)

5 Alhadi T., B.K. Vonderhaar:
Induction of cryptic lactogenic hormone binding in livers of adult female mice treated neonatally with estradiol or nafoxidine.
Endocrinology 110, 254 (1982)

6 Ammann A.J., R.J. Duquesnoy, R.A. Good:
Endocrinological studies in ataxia-telangiectasia and other immunological deficiency diseases.
Clin. Exp. Immunol. 6, 587 (1970)

7 Archer J.A., P. Gorden, J.R. Gavin, M.A. Lesniak, J. Roth:
Insulin receptors in circulating lymphocytes: application to the study of insulin resistence in man.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 627 (1973)

8 Archer J.A., P. Gorden, J. Roth:
Defect in insulin binding to receptors in obese man. Amelioration with caloric restriction.
J. Clin. Invest. 55, 166 (1976)

9 Arrenbrecht S.:
Specific binding of GH to thymocytes.
Nature 252, 255 (1974)

10 Astaldi A., B. Yalcin, G. Meardi, G.R. Burgio, R. Merolla, G. Astaldi:
Effect of GH on lymphocyte transformation in cell culture.
Blut 26, 74 (1973)

11 Ayalon D., M.R. Peyser, R. Limor, J.B. Lessing, R. Ravid:
Paradoxical hypersecretion of GH in patients with endometrial atypical hyperplasia and carcinoma. Effect of hysterectomy.
Gynecol. Obstet. Invest. 13, 9 (1982)

12 Bach F.H., B. Bonavida, E.S. Vitetta, C.F. Fox:
T and B lymphocytes: recognition and function.
New York, Academic Press (1979)

13 Ballmer K., M.M. Burger:
Modulation of EGF binding and action by succinylated concanavalin A in fibroblast cell culture.
J. Supramol. Struct. 14, 209 (1981)

14 Bar R.S., P. Gorden, J. Roth, R. De Meyts, C.R. Kahn:
Fluctuation in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients.
J. Clin. Invest. 58, 1123 (1976)

15 Bar R.S., M.L. Peacock, M.M. Rechler, S.P. Nissley:
Receptors for multiplication-stimulating activity on human arterial and venous endothelial cells.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 52, 814 (1981)

16 Bar R.S., J.C. Goldsmith, M.M. Rechler, M.L. Peacock, S.P. Nissley:
Interactions of multiplication-stimulating activity with bovine endothelium: comparative studies in primary, passaged and cloned cultures from the pulmonary and systemic circulation.
Endocrinology 110, 990 (1982)

17 Barazzone P., M.A. Lesniak, P. Gorden. P. Van Obberghen, J.L. Carpentier, L. Orci:
Binding, internalization and lysosomal association of ^{125}J-hGH in cultured human lymphocytes: a quantitative morphological and biochemical study.
J. Cell Biol. 87, 360 (1980)

18 Bartolini P., L.M. De Assis, M.L. Fonseca:
Radioiodination of human growth hormone with characterization and minimization of the commonly defined 'damaged products'.
Clin. Chim. Acta 110, 177 (1981)

19 Baumann G., S.P. Nissley:
Somatomedin generation in response to activated and non-activated isohormones of human growth hormone.
J. Clin. Endocrinol. 48, 246 (1979)

20 Baxter R.C., J.R. Turtle:
Regulation of hepatic GH receptors by insulin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 350 (1978)

21 Baxter R.C., J.M. Bryson, J.R. Turtle:
Changes in rat liver prolactin binding sites in diabetes are sex dependent.
Metabolism 30, 211 (1981)

22 Baxter R.C., Z. Zaltsman, J.R. Turtle:
Induction of somatogenic receptors in livers of hypersomatotropic rats.
Endocrinology 111, 1020 (1982)

23 Becker M.D., G.C. Cook, A.D. Wright:
Paradoxical elevation of GH in active chronic hepatitis.
Lancet II, 1035 (1969)

24 Begemann H., J. Rastetter:
Atlas der klinischen Hämatologie
3. Auflage, Heidelberg, Springer Verlag (1978)

25 Beisel W.R., K.A. Woeber, P.J. Bartelloni, S. Ingbar:
Growth hormone response during sandfly fever.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 1220 (1968)

26 Beitens J.Z., M.C. Rattazzi, M.H. MacGillivray:
Conversion of radiolabeled hGH into higher molecular weight moieties in human plasma in vivo and in vitro.
Endocrinology 101, 350 (1977)

27 Benker G., R. Windeck, K. Hackenberg, D. Reinwein:
Heterogenität von Peptid- und Proteohormonen. Bedeutung für die Klinik.
Dtsch. med. Wschr. 102, 970 (1977)

28 Bennett G.V., P. Cuatrecasas:
Insulin receptor of fat cells in insulin-resistant metabolic states.
Science 176, 805 (1972)

29 Benveniste R., M.E. Stachura, M. Szabo, L.A. Frohman:
Big growth hormone: conversion to small GH without peptide bond cleavage.
J. Clin. Endocrinol. Metabol. 41, 422 (1975)

30 Benveniste R., L.A. Frohman:
An immunological approach to the study of protein conformational heterogeneity : its application to growth hormone.
Endocrinology 102, 198 (1978)

31 Berdel W.E., U. Fink, B. Egger, A. Reichert, P.G. Munder, J. Rastetter:
Growth inhibition of malignant hypernephroma cells by autologous lysophospholipid incubated macrophages obtained by a new method.
Anticancer Research 1, 135 (1981)

32 Bierich J.R., D. Schönberg:
Wachstumsstörungen, in: Knochen-Gelenke-Muskeln
Band VI/1B, Handbuch der Inneren Medizin, hrg. von F. Kuhlencordt, H. Bertelheimer
Heidelberg, Springer-Verlag (1980)

33 Bierich J.R., H. Enders, U. Heinrich, R. Huenges, M.B. Ranke, D. Schoenberg:
Review: Stunted growth with more or less normal appearance.
Eur. J. Pediatr. 139, 214 (1982)

34 Bierich J.R., M.B. Ranke, B. Stöver, L. Fryklund, B. Strindberg:
Growth promotion by biosynthetic hGH in pituitary dwarfism. Advance abstracts of papers, XIV. Acta Endocrinologica Congress, Stockholm (1983)

35 Birnbaumer L., S.L. Pohl:
Relation of glucagon-specific binding sites to glucagon-dependent stimulation of adenylyl cyclase activity in plasma membranes of rat liver.
J. Biol. Chem. 248, 2056 (1973)

36 Blecher M.:
Methods in receptor research
Part I & II, New York, Marcel Dekker inc. (1976)

37 Blethen S.L., V.V. Weldon:
hGH and other proteins prepared by recombinant DNA technology.
Am. J. Dis. Child. 136, 669 (1982)

38 Bockaert J., S. Jard, F. Morel:
Uptake of oxytocin-^{3}H by frog skin and bladder epithelial cells.
Am. J. Physiol. 219, 1514 (1970)

39 Borges J.L.C., R.M. Blizzard, M. Gelato, R. Furlanetto, A.D. Rogol, M. Lee Vance, D.L. Kaiser:
Effects of human pancreatic tumour GH-releasing factor on GH and SM C levels in patients with idiopathic GH deficiency.
Lancet II, 119 (1983)

40 Bottazzo G.F., C. McIntosh, W. Stanford, M. Preece:
Growth hormone cell antibodies and partial GH deficiency in a girl with Turner's syndrome.
Clin. Endocrinol. 12, 1 (1980)

41 Bourne G.A., M.R. Dockrill, S. Regiani, J.C. Marshall, A.H. Payne:
Induction of testicular GnRH-receptors by GnRH: effects of pituitary hormones and relationship to inhibition of testosterone production.
Endocrinology 110, 727 (1982)

42 Boyum A.:
A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 97:21, 51 (1968)

43 Brown A.E., M.P. Lok, J. Elovson:
Improved method for the isolation of rat liver plasma membrane.
Biochim. Biophys. Acta 426, 418 (1976)

44 Buckland P.R., C.R. Rickards, R.D. Howells, E.D. Jones, B. Rees Smith:
Photo-affinity labelling of the thyrotropin receptor.
FEBS-Letters 145, 245 (1982)

45 Bundesen P.G., R.G. Drake, K. Kelly, I.G. Worsley, H.G. Friesen, A.H. Sehon:
Radioimmunassay for hGH using monoclonal antibodies.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 51, 472 (1980)

46 Burstein S.:
Demonstration by radioligand-binding assay of the structural similarity of a partially synthetic growth hormone recombinant molecule to its natural analog and to native hGH.
J. Clin. Endocrinol. 48, 964 (1979)

47 Butenandt O.:
Humanes Wachstumshormon
Bücherei des Pädiaters, Heft 72
Stuttgart, Enke Verlag (1974)

48 Butenandt O.:
Genetischer und endokriner Minderwuchs
Lövenich, Deutscher Ärzte-Verlag (1974)

49 Butenandt O., Th. Grisar, C. Hager:
Ausschlußdiagnostik einer defizienten Wachstumshormonsekretion in der kinderärztlichen Praxis.
Klin. Pädiat. 190, 460 (1978)

50 Butenandt O.:
Rheumatoid arthritis and growth retardation in children: Treatment with hGH.
Eur. J. Pediatr. 130, 15 (1979)

51 Butenandt O.:
Growth hormone deficiency and GH therapy in Ullrich-Turner-Syndrome.
Klin. Wschr. 58, 99 (1980)

52 Van Buul-Offers S., J.L. Van den Brande:
Binding of somatomedin-A and -C, NSILA and insulin to human placental cell membranes.
Horm. Res. 11, 186 (1979)

53 Van Buul-Offers S., J.L. Van den Brande:
Cellular growth in organs of dwarf mice during treatment with GH, thyroxine and plasma fractions containing somatomedin activity.
Acta Endocrinol. 99, 150 (1982)

54 Cadman H.F., M. Wallis:
An investigation of sites that bind human somatotropin in the liver of the pregnant rabbit.
Biochem. J. 198, 605 (1981)

55 Capeau J., C. Flaig-Staedel, J.-P. Beck, J. Picard:
Insulin-induced receptor regulation in cultured Zajdela rat hepatoma cells and relationship to the stimulation of glycogen synthesis.
Endocrinology 111, 993 (1982)

56 Carr D., H.G. Friesen:
Growth hormone and insulin binding to human liver.
J. Clin. Endocrinol. 42, 484 (1976)

57 Catt K.J., G.W. Tregear, H.G. Burger, C. Kermer:
Antibody coated tube method for radioimmunoassay of hGH.
Clin. Chim. Acta 27, 267 (1970)

58 Catt K.J., J.P. Harwood, G. Aguilera, M.L. Dufau:
Hormonal regulation of peptide receptors and target cell responses.
Nature 280, 109 (1979)

59 Chang K.J., S. Jacobs, P. Cuatrecasas:
Quantitative aspects of hormone-receptor interactions of high affinity. Effect of receptor concentration and measurement of dissociation constants of labeled and unlabeled hormones.
Biochim. Biophys. Acta 406, 294 (1975)

60 Chernausek S.D., S. Jacobs, J.J. Van Wyk:
Structural similarities between human receptors for SM-C and insulin: analysis by affinity labeling.
Biochemistry 20, 7345 (1981)

61 Chernausek S.D., L.E. Underwood, J.J. Van Wyk:
Influence of hypothyroidism on GH binding by rat liver.
Endocrinology 111, 1534 (1982)

62 Chiauzzi V., S. Cigorraga, M.E. Escobar, M.A. Rivarola, E.H. Charreau:
Inhibition of FSH-receptor binding by circulating immunoglobulins.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 54, 1221 (1982)

63 Chinkers M., J.A. McKanna, S. Cohen:
Rapid rounding of human epidermoid carcinoma cells A-431 induced by epidermal growth factor.
J. Cell Biol. 88, 422 (1981)

64 Clark J.B., C.M. Clark:
Age-related changes in insulin receptor regulation in liver membranes from Zucker fatty rats.
Endocrinology 111, 964 (1982)

65 Clarke W.C., V.V. Weldon:
GH deficiency and Fanconi anaemia
J. Ped. 86, 814 (1975)

66 Cohen K.L.:
Metabolic, endocrine and drug-induced interference with pituitary function test: a review.
Metabolism 26, 1165 (1977)

67 Cohen H.N., J.A. Fyffe:
Somatomedins and other serum growth factors: a review of current concepts.
Scott. Med. J. 25, 50 (1981)

68 Conn P.M., M. Conti, J.P. Harwood, M.L. Dufau, K.J. Catt:
Internalisation of gonadotrop in receptor complex in ovarian luteal cells.
Nature 274, 598 (1978)

69 Conne B.S., S. Scaglioni, U. Lang, P.C. Sizonenko, M.L. Aubert:
Pituitary receptor sites for gonadotropin-releasing hormone: effect of castration and substitutive therapy with sex steroids in the male rat.
Endocrinology 110, 70 (1982)

70 Costrini N.V., M. Kogan:
Lectin-induced inhibition of nerve growth factor binding by receptors of sympathetic ganglia.
J. Neurochem. 36, 1175 (1981)

71 Cuatrecasas P.:
Interactions of insulin with the cell membrane: the primary action of insulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 450 (1969)

72 Cuatrecasas P., G. Illiano:
Membrane sialic acid and the mechanism of insulin action in adipose tissue cells. Effects of digestion with neuraminidase.
J. Biol. Chem. 246, 4938 (1971)

73 Cuatrecasas P.:
Perturbation of the insulin receptor of isolated fat cells with proteolytic enzymes. Direct measurements of insulin-receptor interactions.
J. Biol. Chem. 246, 6522 (1971)

74 Cuatrecasas P.:
Unmasking of insulin receptors in fat cells and fat cell membranes. Perturbation of membrane lipids.
J. Biol. Chem. 246, 6532 (1971)

75 Cuatrecasas P.:
Properties of the insulin receptor of isolated fat cell membranes.
J. Biol. Chem. 246, 7265 (1971)

76 Cuatrecasas P.:
Properties of the insulin receptor isolated from liver and fat cell membranes.
J. Biol. Chem. 247, 1980 (1972)

77 Cuatrecasas P.:
Membrane receptors.
Ann. Rev. Biochem. 43, 168 (1974)

78 Czech M.P., J.C. Lawrence, W.S. Lynn:
Hexose transport in isolated brown fat cells. A model system for investigating insulin action on membrane transport.
J. Biol. Chem. 249, 5421 (1974)

79 Dahn M., J.R. Kirkpatrick, D. Bouwman:
Sepsis, glucose intolerance and protein malnutrition: a metabolic paradox.
Arch. Surg. 115, 1414 (1980)

80 Daughaday W.H., W.D. Salmon, F. Alexander:
Sulfation factor activity with sera from patients with pituitary disorders.
J. Clin. Endocrinol. 19, 743 (1959)

81 Daughaday W.H.:
Sulfation factor regulation of skeletal growth. A stable mechanism dependent on intermittent growth hormone secretion.
Am. J. Med. 50, 277 (1971)

82 Davies P.J.A., D.R. Davies, A. Levitzki, F.R. Maxfield, P. Milhaud, M.C. Willingham, J.H. Pastan:
Transglutaminase is essential in receptor mediated endocytosis of alpha$_2$-macroglobulin and polypeptide hormones.
Nature 283, 162 (1980)

83 Desai L.S., H. Lazarus, C.H. Li, G.E. Foley:
Human leukemic cells: effect of hGH.
Exp. Cell Res. 81, 330 (1973)

84 Dijane J., P. Durand, P.A. Kelly:
Evolution of prolactin receptors in rabbit mammary gland during pregnancy and lactation.
Endocrinology 100, 1348 (1977)

85 Douglas J.G., G.P. Brown:
Effect of prolonged low dose infusion of angiotensin II and aldosterone on rat smooth muscle and adrenal angiotensin II receptors.
Endocrinology 111, 988 (1982)

86 Drachman D.B.:
Immunopathology of receptors. Introduction.
Fed. Proc. 38, 2606 (1979)

87 Drake R.G., H.G. Friesen:
Antibodies to prolactin receptors and growth hormone receptors.
Methods in Enzymology 74, 380 (1981)

88 Dumont F., F. Robert, P. Bischoff:
T- and B-lymphocytes in pituitary dwarf Snell-Bagg mice.
J. Immunol. 38, 23 (1979)

89 Eastman R.C., H.M. Goodman:
Insensitivity of adipocytes of hypophysectomized rats to GH and insulin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 168 (1971)

90 Eastman R.C., M.A. Lesniak, J. Roth, P. de Meyts, P. Gorden:
Regulations of receptor by homologous hormone enhances sensitivity and broadens scope of RRA for hGH.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 49, 262 (1979)

91 Edelman G.M.:
Surface modulation in cell recognition and cell growth.
Science 192, 218 (1976)

92 Edén S., J. Schwartz, J.L. Kostyo:
Effects of preincubation on the ability of rat adipocytes to bind and to respond to GH.
Endocrinology 111, 1505 (1982)

93 Edén S.:
GH receptors in isolated adipocytes and chondrocytes.
Advance abstracts of papers XIV. Acta Endocrin. Congr. Stockholm (1983)

94 Editorial:
Growth-hormone-releasing factor
Lancet II, 143 (1983)

95 Elders M.J., D.E. Hill, H.K. Schedewie, V. Herzberg, M. Boughter, S.I. Taylor:
Characterization of the erythrocyte insulin receptor in leprechaunism.
Clin. Res. 30, 897A (1982)

96 Ellis S., M.A. Vodian, R.E. Grindeland:
Studies on the bioassayable GH-like activity of plasma.
Rec. Progr. Horm. Res. 34, 213 (1978)

97 Eshet R., S. Manheimer, P. Chobsieng, Z. Laron:
Human GH-receptors in human circulating lymphocytes.
Horm. Metab. Res. 7, 352 (1975)

98 Eshet R., S. Peleg, Z. Laron:
Direct visualization of hGH binding to receptors of IM-9 human cultured lymphocytes.
ESPE, 21. Annual Meeting, Helsinki (1982)

99 Etzrodt H., K.A. Musch, M. Schleyer, E.F. Pfeiffer:
GH radioligand assay unresponsive to human prolactin.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 42, 1184 (1976)

100 Ewen E.C., M.P. Warren:
Miniiodination of gonadotropic hormones.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 56, 326 (1983)

101 Fabris N., W. Pierpaoli, E. Sorkin:
Hormones and the immunological capacity. III. The immunodeficiency disease of the hypopituitary Snell-bagg dwarf mouse.
Clin. Exp. Immunol. 9, 209 (1971)

102 Fix J.A., W.V. Moore:
Human growth hormone binding to rat hepatocytes: effects of selected hormones on binding.
Biochem. Med. 25, 1 (1981)

103 Fleisher T.A., R.M. White, S. Broder, S.P. Nissley, R.M. Blaese, J.J. Mulvihill, G. Olive, T.A. Waldmann:
X-linked hypogammaglobulinemia and isolated GH deficiency.
New Engl. J. Med. 302, 1429 (1980)

104 Foley T.P., S.P. Nissley, R.L. Stevens, G.L. King, V.C. Hascall, R.E. Humbel, P.A. Short, M.M. Rechler:
Demonstration of receptors for insulin and insulin-like factors on Swarm rat chondrosarkoma chondrocytes. Evidence that insulin stimulates proteoglycan synthesis through the insulin receptor.
J. Biol. Chem. 257, 663 (1982)

105 Fraker P.J., J.C. Speck:
Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-Tetrachloro-3a,6a-Diphenyl-glycoluril.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849 (1978)

106 Freychet P., J. Roth, D.M. Neville:
Insulin receptors in the liver: specific binding of ^{125}J-insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1833 (1971)

107 Freychet P., R. Kahn, J. Roth, D.M. Neville:
Insulin interactions with liver plasma membranes.
J. Biol. Chem. 247, 3953 (1972)

108 Friesen H.C.:
Prolactin and GH receptors: regulation and characterization.
Fed. Proc. 38, 2610 (1979)

109 Friesen H.G., R.P.C. Shiu, H. Elsholtz, S. Simpson, J. Hughes:
Prolactin and growth hormone receptors, in:
Receptors, antibodies and disease, hrg. v. Evered D., J. Whelan, Ciba Foundation Symposium 90, London, Pitman (1982)

110 Frohman L.A., L. Burek, M.E. Stachura:
Characterization of GH of different molecular weights in rat, dog and human pituitary.
Endocrinology 91, 262 (1972)

111 Frohman L.A., M.E. Stachura:
Evidence for possible precursors in the synthesis of GH by rat and human fetal anterior pituitary in vitro.
Mt. Sinai J. Med. 40, 414 (1973)

112 Fryklund L., H. Sievertsson:
Primary structure of somatomedin-B. A GH-dependent serum factor with protease inhibiting activity.
FEBS Letters 87, 55 (1978)

113 Fudenberg H.H., D.P. Stites, J.L. Caldwell, J.V. Wells:
Basic and clinical immunology.
Third edition, Los Altos California, Lange Medical Publications (1982)

114 Garnier P.E., J.-C. Job:
Correlative study of RRA and RIA of serum growth hormone in children: I. Normal children and hGH-treated pituitary dwarfs.
Acta Endocrinol. 86, 50 (1977)

115 Garnier P.E., A.M. Repellin, J.-C. Job:
Correlative study of RRA and RIA of serum growth hormone i children: II: Primary genetic and intra-uterine growth retardation.
Acta Endocrinol. 88, 227 (1978)

116 Gavin J.R., J. Roth, P. Jen, P. Freychet:
Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 747 (1972)

117 Gavin J.R., J.A. Archer, M.A. Lesniak, P. Gorden, J. Roth:
Hormone-receptor interactions in circulating cells: studies in normal and pathologic states in man.
J. Clin. Invest. 51, 35a (1972)

118 Gavin J.R., C.R. Kahn, P. Gorden, J. Roth, D.M. Neville, R.E. Humble:
RRA for insulin
Diabetes 22, 306 (1973)

119 Gavin J.R., J. Roth, D.M. Neville, P. de Meyts, D.N. Buell:
Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 84 (1974)

120 Gavin J.R., R.J. Saltman, S.E. Tollefsen:
Growth hormone receptors in isolated rat adipocytes.
Endocrinology 110, 637 (1982)

121 Goeddel D.V., H.L. Heyneker, T. Hozumi, R. Arentzen, K. Itakura, D. Yansura, M. Ross, G. Miozzari, R. Crea, P. Seeburg:
Direct expression in E. coli of a DNA sequence coding for hGH.
Nature 281, 544 (1979)

122 Golde D.W., N. Bersch, C.H. Li:
Growth hormone modulation of murine erythroleukemia cell growth in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3437 (1978)

123 Golde D.W., H.R. Hershman, A.J. Lusis, J.E. Groopman:
Growth factors.
Ann. Intern. Med. 92, 650 (1980)

124 Goodman A.D., D.R. Wright, K.D. Trimble:
Studies on 'big hGH' from human plasma and pituitary.
J. Clin. Invest. 54, 1064 (1974)

125 Goodman H.M., G. Grichting, E. Gorin:
Receptors for GH in adipose tissue and their relationship to refractoriness and sensitivity to its insulin-like effects.
Advance abstracts of papers, XIV. Acta Endocrinol. Congr. Stockholm (1983)

126 Gorden P., J.R. Gavin, C.R. Kahn, J.A. Archer, M. Lesniak, C. Hendricks, D.M. Neville, J. Roth:
Application of RRA to circulating insulin, GH and to their tissue receptors in animals and man.
Pharmacol. Rev. 25, 179 (1973)

127 Gorden P., M.A. Lesniak, C.M. Hendricks, J. Roth:
'Big' growth hormone components from human plasma: decreased reactivity demonstrated by radioreceptor assay.
Science 182, 829 (1973)

128 Gorden P., C.M. Hendricks, J. Roth:
Evidence for 'big' and 'little' components of human plasma and pituitary growth hormone.
J. Clin. Endocrinol. 36, 178 (1973)

129 Gorden P., J. Roth, J. Archer, D. Buell:
Characteristics of the human lymphocyte insulin receptor.
J. Biol. Chem. 248, 2202 (1973)

130 Gorden P., M.A. Lesniak, C.M. Hendricks, J. Roth, W. McGuffin, J.R. Gavin:
hGH-characterization of plasma and pituitary components and application of a new radioreceptor assay.
Israel J. Med. Sci. 10, 1239 (1974)

131 Gorden P., J.-L. Carpentier, E. van Obberghen, P. Barazzone, J. Roth, L. Orci:
Insulin-induced receptor loss in the cultured human lymphocyte: quantitative morphological perturbations in the cell and plasma membrane.
J. Cell Sci. 39, 77 (1979)

132 Gorden P., J.-L. Carpentier, P. Freychet, L. Orci:
Internalization of polypeptide hormones. Mechanism, intracellular localization and significance.
Diabetologia 18, 263 (1980)

133 Gorden P., J.-L. Carpentier, P. Freychet, L. Orci:
Morphologic probes of polypeptide hormone receptor interactions.
J. Histochem. Cytochem. 28, 811 (1980)

134 Gorden P., J.-L. Carpentier, M.L. Moule, C.C. Yip, L. Orci:
Direct demonstration of insulin receptor internalization - a quantitative electron microscopic study of covalently bound ^{125}J-photoreactive insulin incubated with isolated hepatocytes.
Diabetes 31, 659 (1982)

135 Gottsman M., von Werder K.:
hGH-receptor protein in rabbit liver microsomes.
Acta Endocrinol. 82, 40 (1976)

136 Grossman A., M.O. Savage, J.A.H. Wass, N. Lytras, J. Sueiras-Diaz, D.H. Coy, G.M. Besser:
GH-releasing factor in GH deficiency: demonstration of a hypothalamic defect in GH release.
Lancet II 137 (1983)

137 Guyda H.J.:
Heterogeneity of human growth hormone and prolactin secreted in vitro: immunoassay and radioreceptor assay correlations.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 953 (1975)

138 Hall K.:
Human somatomedin. Determination, occurrence, biological activity and purification.
Acta Endocrinol. 163, 1 (1972)

139 Harris-Warrick R.M., M.A. Bothwell, E.M. Shooter:
Subunit interactions inhibit the binding of beta nerve growth factor to receptors on embryonic chick sensory neurons.
J. Biol. Chem. 255, 11284 (1980)

140 Heinrich G.:
Peptide hormone receptors.
New Engl. J. Med. 306, 1368 (1982)

141 Heldin C.-H., B. Westermark, A. Wasteson:
Desensitization of cultured glial cells to epidermal growth factor by receptor down-regulation.
Nature 282, 419 (1979)

142 Hepp K.D., J. Langley, H.J. von Funke, R. Renner, W. Kemmler
Increased insulin binding capacity of liver membranes from diabetic Chinese hamsters.
Nature 258, 154 (1975)

143 Herington A.C., L.S. Jacobs, W.H. Daughaday:
Radioreceptor and radioimmunoassay quantitation of human growth hormone in acromegalic serum: overstimation by immunoassay and systematic differences between antisera.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 257 (1974)

144 Herington A.C., L.S. Phillips, W.H. Daughaday:
Pituitary regulation of hGH binding sites in rat liver membranes.
Metabolism 25, 341 (1976)

145 Herington A.C., N.M. Veith:
Solubilization of a GH-specific receptor from rabbit liver.
Endocrinology 101, 984 (1977)

146 Herington A.C.:
Ontogenesis of hepatic growth hormone receptors in the rat.
Horm. Metab. Res. 14, 422 (1982)

147 Hinkle P.M., A.H. Tashjian:
Thyrotropin-releasing hormone regulates the number of its own receptors in the GH_3 strain of pituitary cells in culture.
Biochemistry 14, 3845 (1975)

148 Hinterberger W., K. Kletter, W. Waldhäusl:
Binding of human growth hormone to human peripheral lymphocytes.
Horm. Metab. Res. 8, 492 (1976)

149 Hizuka N., P. Gorden, M.A. Lesniak, E. Van Obberghen, J.-L. Carpentier, L. Orci:
Polypeptide hormone degradation and receptor regulation are coupled to ligand internalization. A direct biochemical and morphologic demonstration.
J. Biol. Chem. 256, 4591 (1981)

150 Hizuka N., P. Gorden, M.A. Lesniak, J.-L. Carpentier, L. Orci:
Effect of pH and lysosomotropic agents on membrane-associated and internalized ^{125}J-iodinated human GH in cultured human lymphocytes: a quantitative biochemical and electron microscopic study.
Endocrinology 111, 1576 (1982)

151 Hobom B.:
Genchirurgie: an der Schwelle zur synthetischen Biologie.
Med. Klin. 75, 834 (1980)

152 Hofmann K., W. Wingender, F.M. Finn:
Correlation of adrenocorticotropic activity of ACTH-analogs with degree of binding to an adrenal cortical particulate preparation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 829 (1970)

153 Horner J.M., F. Liu, R.L. Hintz:
Comparison of ^{125}J-somatomedin-A and ^{125}J-SM-C RRAs for somatomedin peptide content in whole and acid-chromatographed plasma.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 47, 1287 (1978)

154 Horwitz D.A., M.A. Garrett:
Distinctive functional properties of human blood lymphocytes: a comparison with T-lymphocytes, B-lymphocytes and monocytes.
J. Immunol. 118, 1712 (1977)

155 Howse P.M., P.H.W. Rayner, J.W. Williams, B.T. Rudd, P.V. Bertraude, C.R.S. Thompson, L.A. Jones:
Nyctohemeral secretion of growth hormone in normal children of short stature and in children with hypopituitarism and intrauterine growth retardation.
Clin. Endocrinol. 6, 347 (1977)

156 Hughes J.P., T. Tanaka, P.W. Gout, C.T. Beer, R.L. Noble, H.G. Friesen:
Effect of iodination on hGH and PRL: characterized by bioassay, radioimmunassay, radioreceptorassay and electropheresis.
Endocrinology 111, 827 (1982)

157 Huhtaniemi J.T., R.N. Clayton, K.J. Catt:
Gonadotropin binding and Leydig cell activation in the rat testis in vivo.
Endocrinology 111, 982 (1982)

158 Hunter W.M., F.C. Greenwood:
Preparation of iodine-131 labelled hGH of high specific activity.
Nature 194, 495 (1962)

159 Inagaki Y., K. Kohmoto:
Changes in Scatchard Plots for insulin binding to mammary epithelial cells from cycling, pregnant and lactating mice
Endocrinology 110, 176 (1982)

160 Isaksson O.G.P., J.-O. Jansson, J.A.M. Gause:
Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly.
Science 216, 1237 (1982)

161 Jwasaki M., M. Kobayashi, S. Ohgaku, H. Maegawa, Y. Shigate:
Effect of L-Dopa administration on insulin-binding: possible role of growth hormone in regulation of insulin receptor affinity.
Horm. Metab. Res. 14, 342 (1982)

162 Jansson J.O., K. Albertsson-Wikland, S. Eden, K.G. Thorngren, O.G.P. Isaksson:
Circumstantial evidence for a role of the secretory pattern of growth hormone in control of body growth.
Acta Endocrinol. 99, 24 (1982)

163 Jarett L., R.M. Smith:
Electron microscopic demonstration of insulin receptors on adipocyte plasma membrane utilizing a ferritin-insulin conjugate.
J. Biol. Chem. 249, 7024 (1974)

164 Johnsonbaugh R.E., E.M. Ritzen, K. Hall:
Hormonal influences on the growth of lectin-stimulated lymphocytes.
ESPE, 21. Annual Meeting, Helsinki (1982)

165 Jondal M., H. Wigzell, F. Aiuti:
Human lymphocyte subpopulations: classification according to surface markers and/or functional characteristics.
Transplant. Rev. 16, 163 (1973)

166 Julius M.H., E. Simpson, J.A. Herzenberg:
A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes.
Eur. J. Immunol. 3, 645 (1973)

167 Kahn C.R., D.M. Neville, P. Gorden, P. Freychet, J. Roth: Insulin receptor defect in insulin resistance: studies in the obese-hyperglycemic mouse. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 135 (1972)

168 Kahn C.R., D.M. Neville, J. Roth: Insulin-receptor interaction in the obese-hyperglycemic mouse. J. Biol. Chem. 248, 244 (1973)

169 Kahn C.R.: Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. J. Cell Biol. 70, 261 (1976)

170 Kahn C.R., J.D. Goldfine, D.M. Neville, P. de Meyts: Alterations in insulin binding induced by changes in vivo in the levels of glucocorticoids and GH. Endocrinology 103, 1054 (1978)

171 Kahn C.R.: Autoantibodies to the insulin receptor: clinical and molecular aspects. Fed. Proc. 38, 2607 (1979)

172 Kaplan M.E., C. Clark: An improved rosetting assay for detection of human T-lymphocytes. J. Immunol. Meth. 5, 131 (1974)

173 Karlsson F.A., E. Van Obberghen, C. Grunfeld, C.R. Kahn: Desensitization of the insulin receptor at an early post-receptor step by prolonged exposure to antireceptor antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 809 (1979)

174 Kato S., T. Nakamura, A. Ichihara: Regulatory regulation between insulin receptor and its functional responses in primary cultured hepatocytes of adult rats. J. Biochem. 92, 699 (1982)

175 Katz D.H.:
Lymphocyte differentiation, recognition and regulation.
Academic Press, New York (1977)

176 Keefer L.M., P. de Meyts:
Glycosylation of cell surface receptors: tunicamycin treatment decreases insulin and GH binding to different levels in cultured lymphocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 22 (1981)

177 Kelly L., D. Puett:
Preparation and characterization of a novel group of pituitary-derived peptides stimulatory for DNA synthesis in fibroblasts.
Biochim. Biophys. Acta 626, 397 (1981)

178 Kelly P.A., B.I. Posner, H.G. Friesen, T. Tsushima:
Studies of insulin, GH and prolactin binding: ontogenesis, effects of sex and pregnancy.
Endocrinology 95, 532 (1974)

179 Kelly P.A., B.I. Posner, H.G. Friesen:
Effects of hypophysectomy, ovariectomy and cycloheximide on specific binding sites for lactogenic hormones in rat liver.
Endocrinology 97, 1408 (1975)

180 Kemp S.F., R.G. Rosenfeld, F. Liu, S. Gaspich, R.L. Hintz:
Acute somatomedin response to growth hormone: radioreceptor assay versus radioimmunoassay.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 52, 616 (1981)

181 Ketelslegers J.-M., G.D. Knott, K.J. Catt:
Kinetics of gonadotropin binding by receptors of the rat testis. Analysis by a nonlinear curve-fitting method.
J. Biochem. 14, 3075 (1975)

182 Kiess W., H. Holtmann, O. Butenandt, R. Eife:
Modulation of lymphoproliferation by hGH.
Eur. J. Pediatr. 140, 47 (1983)

183 King A.C., P. Cuatrecasas:
Peptidehormone-induced receptor mobility, aggregation and internalization.
New Engl. J. Med. 305, 77 (1981)

184 Klotz I.M.:
Numbers of receptor sites from Scatchard graphs: facts and fantasies.
Science 217, 1247 (1982)

185 Knobil E., R.O. Greep:
The physiology of GH with particular reference to its action in the Rhesus monkey and the 'species specifity' problem.
Rec. Progr. Horm. Res. 15, 1 (1959)

186 Koebberling J., K. von Werder:
Comments to the paper by Weber et al., Psoriasis and hGH aetiology and therapy.
Arch. Dermatol. Res. 271, 463 (1981)

187 Kono T., F.W. Barham:
The relationship between the insulin-binding capacity of fat cells and the cellular response to insulin. Studies with intact and trypsin-treated fat cells.
J. Biol. Chem. 246, 6210 (1971)

188 Koppelman M.C.S., M.L. Dufau:
Prolactin receptors in luteinized rat ovaries: unmasking of specific binding sites with detergent treatment.
Endocrinology 111, 1350 (1982)

189 Krug U., F. Krug, P. Cuatrecasas:
Emergence of insulin receptors on human lymphocytes during in vitro transformation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2604 (1973)

190 Laron Z., A. Kowadlo-Silbergeld, R. Eshet, A. Pertzelan:
Growth hormone resistance.
Ann. Clin. Res. 12, 269 (1981)

191 Laron Z.:
Somatomedin, insulin, growth hormone and growth: a review.
Isr. J. Med. Sci. 18, 823 (1982)

192 Laron Z., O. Butenandt (Herausgeber)
Evaluation of growth hormone secretion.
Volume 12, Pediatric and Adolescent Endocrinology.
S. Karger, Basel (1983)

193 Lawrence J.H., C.A. Tobias, J.A. Linfoot, J.L. Born, J.T. Lyman, C.Y. Chong, E. Manougian, W.C. Wei:
Successful treatment of acromegaly: metabolic and clinical studies in 145 patients.
J. Clin. Endocrinol. 31, 180 (1970)

194 Lefkowitz R.J., J. Roth, J. Pastan:
Radioreceptor assay of adrenocorticotropic hormone: new approach to assay of polypeptide hormones in plasma.
Science 170, 633 (1970)

195 Lefkowitz R.J., J. Roth, J. Pastan:
Effects of calcium on ACTH stimulation of the adrenal: separation of hormone binding from adenyl cyclase activity.
Nature 228, 864 (1970)

196 Lesniak M.A., P. Gordon, J. Roth, J.R. Gavin:
Human growth hormone radioreceptor assay using cultured human lymphocytes.
Nature 241, 20 (1973)

197 Lesniak M.A., J. Roth, P. Gordon, J.R. Gavin:
Binding of ^{125}J-hGH to specific receptors in human cultured lymphocytes.
J. Biol. Chem. 249, 1661 (1974)

198 Lesniak M.A., J. Roth:
Regulation of receptor concentration by homologous hormone: Effect of human growth hormone on its receptor in IM-9-lymphocytes.
J. Biol. Chem. 251, 3720 (1976)

199 Lesniak M.A., P. Gordon, J. Roth:
Reactivity of non-primate GHs and prolactins with human GH receptors on cultured human lymphocytes.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 838 (1977)

200 Lewis U.J., S.M. Peterson, L.F. Bonewald, B.K. Seavey, W.P. Vanderlaan:
An interchain disulfide dimer of hGH.
J. Biol. Chem. 252, 3697 (1977)

201 Li C.H., J.S. Dixon:
Human pituitary growth hormone. XXXII. The primary structur of the hormone: revision.
Arch. Biochem. Biophys. 146, 233 (1971)

202 Linkowski P., H. Brauman, J. Mendlewicz:
GH after TRH in woman with depressive illness.
Br. J. Psych. 137, 229 (1980)

203 Liu S.Y., T.C. Goodfriend:
Angiotensin receptors.
Am. J. Physiol. 218, 1319 (1970)

204 Loumaye E., Z. Naor, K.J. Catt:
Binding affinity and biological activity of gonadotropin-releasing hormone agonists in isolated pituitary cells.
Endocrinology 111, 730 (1982)

205 Maes M., J.M. Ketelslegers:
Liver somatogenic (GH) and lactogenic (PRL) binding sites in acutely fasted and refed rats.
ESPE, 21. Annual Meeting, Helsinki (1982)

206 Marshall S., J.W. Olefsky:
Effects of insulin incubation on insulin binding, glucose transport, and insulin degradation by isolated rat adipocytes: evidence for hormone-induced desensitization at the receptor and postreceptor level.
J. Clin. Invest. 66, 763 (1980)

207 Marshall W.A.:
Human growth and its disorders.
New York, Academic Press (1977)

208 McCumbee W.D., H.E. Lebovitz, K.S. McCarty:
Hormone responsiveness of a transplantable rat chondrosarcoma. III. Ultrastructural evidence of in vivo hormone dependence.
Am. J. Pathol. 103, 56 (1981)

209 Mercado-Simmen R.C., G.D. Bryant-Greenwood, F.C. Greenwood:
Relaxin receptor in the rat myometrium: regulation by estrogen and relaxin.
Endocrinology 110, 220 (1982)

210 Mercola K.E., M.J. Cline, D.W. Golde:
GH stimulation of normal and leukemic human T-lymphocyte proliferation in vitro.
Blood 58, 337 (1981)

211 Milgrom E., L. Thi, M. Atger, E.-E. Baulieu:
Mechanisms regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus.
J. Biol. Chem. 248, 6366 (1973)

212 Mills J.B., R.B. Ashworth, A.E. Wilhelmi, A.S. Hartree:
Improved method for the extraction and purification of hGH.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 29, 1456 (1969)

213 Misbin R.J., A.M. Moffa, M.S. Kappy:
Insulin binding to monocytes in obese patients treated with carbohydrate restriction and changes in physical activity.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 56, 273 (1983)

214 Miyachi J., A. Chrambach, R. Mecklenburg, M. Lipsett:
Preparation and properties of ^{125}J-LH-RH.
Endocrinology 92, 1725 (1973)

215 Molsberry R.L., B.R. Carr, C.R. Mendelson, E.R. Simpson:
Human chorionic gonadotropin binding to human fetal testes as a function of gestational age.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 55, 791 (1982)

216 Moore W.V., J. Wolff:
Thyroid-stimulating hormone binding to beef thyroid membranes.
J. Biol. Chem. 249, 6255 (1974)

217 Moore W.V., D. Jin:
Polymeric and monomeric hGH binding to rat liver plasma membranes.
J. Clin. Endocrinol. 46, 374 (1978)

218 Morishige W.K.:
Thyroid hormone influence glucocorticoid receptor levels in the neonatal rat lung.
Endocrinology 111, 1017 (1982)

219 Moses A.C., K.L. Cohen, R. Johnsonbaugh, S.P. Nissley:
Contribution of human somatomedin activity to the serum growth requirement of human skin fibroblasts and chick embryo fibroblasts in culture.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46, 937 (1978)

220 Muggeo M., R.S. Bar, J. Roth, C.R. Kahn, P. Gordon:
The insulin resistance of acromegaly: evidence for two alterations in the insulin receptor on circulating monocytes.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 48, 17 (1979)

221 Nakao K., A. Takeda, S. Kagawa, S. Shimizu, A. Matsuoka:
A radioreceptor assay for insulin: direct measurement of human serum insulin.
Horm. Metab. Res. 14, 339 (1982)

222 Neeb S., W. Grabner:
Akromegalie
Med. Klin. 74, 573 (1979)

223 Niall H.D., G.W. Tregear, M.L. Hogan, G.V. Segre, P. Hwang, H. Friesen:
The chemistry of growth hormone and the lactogenic hormones.
Rec. Progr. Horm. Res. 29, 387 (1973)

224 From the NIH:
Insulin and human growth hormone. Triumphs in genetic engineering.
JAMA 245, 1724 (1981)

225 Nissley S.P., J. Passamani, P. Short:
Stimulation of DNA synthesis, cell multiplication and ornithindecarboxylase in 3T3 cells by multiplication stimulating activity.
J. Cell Physiol. 89, 393 (1977)

226 Nixon D.A., R.M. Jordan, N.M. Tresp:
Dissociation of plasma and CSF GH herogeneity.
Clin. Res. 30, 840A (1982)

227 Norstedt C., A. Mode, P. Eneroth, J.A. Gustafsson:
Induction of prolactin receptors in rat liver after the administration of growth hormone.
Endocrinology 108, 1855 (1981)

228 Oberley T.D., J.E. Murphy-Ullrich, J.V. Muth:
Morphologic and immunofluorescence studies of the effect of fibroblast growth factor on the culture of guinea pig glomerular cell strains.
Am. J. Pathol. 103, 129 (1981)

229 Olefsky J., G. Reaven:
The human lymphocyte: a model for the study of insulin-receptor interaction.
J. Clin. Endocrinol. 38, 554 (1974)

230 Pastan J., J. Roth, V. Macchia:
Binding of hormone to tissue: the first step in polypeptide hormone action.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 1802 (1966)

231 Pastan J.:
Regulation of cellular growth.
Adv. Metab. Disord. 8, 7 (1975)

232 Pena C., E. Poskus, A.C. Paladini:
A relevant antigenic site in human GH localized in sequence 98-128.
Mol. Immunol. 17, 1487 (1980)

233 Pfeifle B., H. Ditschuneit:
The effect of insulin and insulin-like growth factors on cell proliferation of human smooth muscle cells.
Artery 8, 336 (1981)

234 Phillips L.S., R. Vassilapoulou-Sellin:
Somatomedins
New Engl. J. Med. 302, 371 (1980)

235 Pierpaoli W., C. Baroni, N. Fabris, E. Sorkin:
Hormones and immunological capacity. II. Reconstitution of antibody production in hormonally deficient mice by somatotropic hormone, thyrotropic hormone and thyroxine.
Immunology 16, 217 (1969)

236 Podskalny J.M., C.R. Kahn:
Cell culture studies on patients with extreme insulin resistance. I. Receptor defects on cultured fibroblasts.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 54, 261 (1982)

237 Posner B.J., P.A. Kelly, H.G. Friesen:
Induction of a lactogenic receptor in rat liver: influence of estrogen and the pituitary.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2407 (1974)

238 Posner B.J., P.A. Kelly, R. Shiu, H.G. Friesen:
Studies of insulin, GH and prolactin binding: tissue distribution, species variation and characterization.
Endocrinology 95, 521 (1974)

239 Posner B.J.:
Insulin receptors in human and animal placental tissue.
Diabetes 23, 209 (1974)

240 Posner B.J.:
Characterization and modulation of GH and prolactin binding in mouse liver.
Endocrinology 98, 645 (1976)

241 Postel-Vinay M.C.:
GH and the regulation of its receptors in rat liver membranes.
Advance abstracts of papers, XIV. Acta Endocrinol. Congr. Stockholm (1983)

242 Raben M.S.:
Human growth hormone.
Rec. Progr. Horm. Res. 15, 71 (1959)

243 Rabkin R., T.I. Gottheiner, V.S. Fang:
Removal and excretion of immunoreactive rat growth hormone by the isolated kidney.
Am. J. Physiol. 240, 282 (1981)

244 Raff M.C.:
Self regulation of membrane receptors.
Nature 259, 265 (1976)

245 Raisz L.G., B.E. Kream:
Hormonal control of sceletal growth.
Ann. Rev. Physiol. 43, 225 (1981)

246 Ranke M.B., C.A. Stanley, D. Rodbard, L. Baker, L. Bongiovanni, J.S. Parks:
Sex differences in binding of human growth hormone to isolated rat hepatocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 847 (1976)

247 Ranke M.B., D. Gupta, J.R. Bierich:
Comparison of circulating hGH measured by RIA and RRA in plasma of children.
Ped. Res. 12, 151 (1978)

248 Ranke M.B., J. Weber, J.R. Bierich:
Long-term response to hGH in 36 children with idiopathic growth hormone deficiency.
Eur. J. Pediatr. 132, 221 (1979)

249 Ray T.K.:
A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver.
Biochim. Biophys. Acta 196, 1 (1970)

250 Reagan C.R., J.B. Mills, J.L. Kostyo, A.E. Wilhelmi:
Isolation and biological characterization of fragments of human GH produced by digestion with plasmin.
Endocrinology 91, 625 (1975)

251 Reinherz E.L., S.F. Schlossman:
Current concepts in immunology. Regulation of the immune response - inducer and suppressor T lymphocyte subsets in human beings.
New Engl. J. Med. 303, 370 (1980)

252 Retegui L.A., R.W. Milne, C.L. Cambiaso, P.L. Masson:
The recognition by monoclonal antibodies of various portions of a major antigenic site of human growth hormone.
Mol. Immunol. 19, 865 (1982)

253 Rieske E., G.W. Kreutzberg, A. Czlonkowska, C.A. Lucas:
Induction of fiber outgrowth in PC 12 pheochromocytoma cells by a neuronotropic factor occurring in human tumors.
Acta Neuropathol. 53, 221 (1981)

254 Rillema J.A., L.Y. Wing, C.M. Cameron:
Effect of various concentrations of prolactin and GH on the magnitude of stimulation of RNA synthesis, casein synthesis and ornithine decarboxylase activity in mouse mammary gland explants.
Horm. Res. 15, 133 (1981)

255 Riopelle R.J., A.K. Sutter, R.M. Harris-Warrick, M. Klearman, E.M. Shooter:
Receptor interactions of nerve growth factor.
Adv. Neurol. 29, 133 (1981)

256 Robinson R.A., M.E. Volkenant, R.J. Ryan, H.L. Moses:
Decreased epidermal growth factor binding in cells growth arrested in G1 by nutrient deficiency.
J. Cell Physiol. 109, 517 (1981)

257 Rodbard D.:
Mathematics of hormone-receptor interaction.
Adv. Exp. Med. Biol. 36, 289 (1973)

258 Rodbell M., M.J. Krans, S.L. Pohl, L. Birnbaumer:
The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. III. Binding of glucagon: method of assay and specifity.
J. Biol. Chem. 246, 1861 (1971)

259 Rogers P.C., D. Komp, A. Rogol, H. Sabio:
Possible effects of GH on development of acute lymphoblastic leukemia.
Lancet II, 434 (1977)

260 Rohrer H., Y.A. Barde:
Presence and disappearance of nerve growth factor receptors on sensory neurons in culture.
Dev. Biol. 89, 309 (1982)

261 Roos P., H.R. Fevold, C.A. Gemzell:
Preparation of hGH by gel filtration.
Biochim. Biophys. Acta 74, 525 (1963)

262 Rosenfeld R.G., S.F. Kemp, S. Gaspich, R.L. Hintz:
In vivo modulation of somatomedin receptor sites: effects of growth hormone treatment of hypopituitary children.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 52, 759 (1981)

263 Roth J.A., L.G. Lomax, N. Altszuler, J. Hampshire, M.L. Kaeberle, M. Shelton, D.D. Draper, A.E. Ledet:
Thymic abnormalities and growth deficiency in dogs.
Am. J. Vet. Res. 41, 1256 (1980)

264 Roth J.:
Assay of peptide hormones using cell receptors: application to insulin and to human growth hormone.
Methods of Enzymology, Vol. XXXVII, 66, New York, Academic Press (1975)

265 Roth J., D. Le Roith, J. Shiloach, J.L. Rosenzweig, M.A. Lesniak, J. Havrankova:
The evolutionary origin of hormones, neurotransmitters and other extracellular chemical messengers.
New Engl. J. Med. 306, 523 (1982)

266 Roth J.:
Peptide hormone binding to receptors: a review of direct studies in vitro.
Metabolism 22, 1059 (1973)

267 Rudman C.G., J.A. Parsons:
Autoradiographic comparison of growth factors: influence of GH and SM-B on patterns of proline incorporation.
Clin. Endocrinol. 15, 319 (1981)

268 Sachs L.:
Statistische Auswertungsmethoden
3. Auflage, Heidelberg, Springer Verlag (1971)

269 Santaló R.C.:
Lymphocyte transformation and transmembrane potential depression.
Exptl. Cell Res. 96, 429 (1975)

270 Santos A., E. Blazquez:
Regulatory effect of glucagon on its own receptor concentrations and target-cell sensitivity in the rat.
Diabetologia 22, 362 (1982)

271 Saxena Q.B., R.K. Saxena, W.H. Adler:
Regulation of natural killer activity in vivo. III. Effect of hypophysectomy and GH treatment on the natural killer activity of the mouse spleen cell population.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 67, 169 (1982)

272 Scatchard G.:
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Am. N.Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949)

273 Schalch D.S., M.L. Parker:
A sensible double antibody immunoassay for human growth hormone in plasma.
Nature 203, 1141 (1964)

274 Schlesinger M.:
Lymphocytes and their cell membranes.
New York, Academic Press (1976)

275 Schwartz R.H., A.R. Bianco, B.S. Handwerger, C.R. Kahn:
Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin-binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leukocyte preparations: implications for studies of insulin-resistance states in man.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 474 (1975)

276 Shewring G., B. Rees Smith:
An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies.
Clin. Endocrinol. 17, 409 (1982)

277 Shires T.K., J.L. Hargrove:
GH inhibition of thyrosine aminotransferase in primary cultures of rat liver cells.
Biochim. Biophys. Acta 714, 170 (1982)

278 Shiu R.P.C., H.G. Friesen:
Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland.
Biochem. J. 140, 301 (1974)

279 Shoyab M., G.J. Todaro:
Perturbation of membrane phospholipids alters the interaction between epidermal growth factor and its membrane receptors.
Arch. Biochem. Biophys. 206, 222 (1981)

280 Sievertsson H., L. Fryklund, K. Uthne, K. Hall, B. Westermark:
Isolation and chemistry of human somatomedins A and B.
Adv. Metab. Disord. 8, 47 (1975)

281 Sigel M.B., N.A. Thorpe, M.S. Kobrin, U.J. Lewis, W.P. Vanderlaan:
Binding characteristics of a biologically active variant of hGH (20K) to GH and lactogen receptors.
Endocrinology 108, 1600 (1981)

282 Singh R.N.D., B.K. Seavey, V.P. Rice, T.T. Lindsey:
Modified forms of human growth hormone with increased biological activities.
Endocrinology 94, 883 (1974)

283 Snow E.C., T.L. Feldbush, J.A. Oaks:
The effect of GH and insulin upon MLC response and the generation of cytotoxic lymphocytes.
J. Immunol. 126, 161 (1981)

284 Soll A.H., C.R. Kahn, D.M. Neville, J. Roth:
Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity.
J. Clin. Invest. 56, 769 (1975)

285 Soman V., A.D. Goodman:
Studies of composition and radioreceptor activity of big and little human growth hormone.
J. Clin. Endocrinol. 44, 569 (1977)

286 Soman V., A.D. Goodman:
Evidence for a hepatic receptor specific for a form of 'big' human growth hormone.
Clin. Res. 23, 333A (1975)

287 Spielman L.L., F.C. Bancroft:
Pregrowth hormone: evidence for conversion to GH during synthesis on membrane-bound polysomes.
Endocrinology 101, 651 (1977)

288 Stachura M.E., L.A. Frohman:
'Large' GH: ribonucleic acid-associated precursor of other GH forms in rat pituitary.
Endocrinology 94, 701 (1974)

289 Stachura M.E., L.A. Frohman:
GH: Independent release of big and small forms from rat pituitary in vitro.
Science 187, 447 (1975)

290 Standaert M.L., R.J. Pollet:
Equilibrium model for insulin-induced receptor down-regulation.
Clin. Res. 30, 855A (1982)

291 Stevenson J.C., D.R. Bangham, J. Zanelli:
Side-effects of calcitonins.
Lancet I, 926 (1983)

292 Sutherland E.W.:
On the biological role of cyclic AMP.
J. Am. Med. Assoc. 214, 128 (1970)

293 Tanner J.M.:
A history of the study of human growth.
Cambridge, University Press (1981)

294 Tata J.R.:
Hormonal regulation of hormone receptors.
Nature 257, 740 (1975)

295 Theml H., H. Begemann:
Lymphozyt und klinische Immunologie.
Heidelberg, Springer Verlag (1975)

296 Thiériot-Prévost G., R.M. Schimpff:
Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans le lymphocyte active et activité somatomédine du serum.
Acad. Sci. (Paris) 290, 527 (1980)

297 Thiériot-Prévost G., R.M. Schimpff:
A hormonally controlled serum factor stimulating the thymidine uptake into lectin-activated lymphocytes.
Acta Endocrinol. 98, 358 (1981)

298 Thorell J.J., B.G. Johannson:
Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}J to high specific activity.
Biochim. Biophys. Acta 251, 363 (1971)

299 Thorngren K.G., L.J. Hansson:
Bioassay of growth hormone and prolactin preparations by determination of longitudinal bone growth with tetracyclin.
Acta Endocrinol. 76, 35 (1974)

300 Thorsson A.V., R.L. Hintz:
Specific ^{125}J-somatomedin receptor on circulating human mononuclear cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 1566 (1977)

301 Tomasi V., S. Koretz, T.K. Ray, J. Dunnick, G.V. Marinetti:
Hormone action at the membrane level. II. The binding of epinephrine and glucagon to the rat liver plasma membranes.
Biochim. Biophys. Acta 211, 31 (1970)

302 Tsushima T., H. Murakami, K. Wakai, O. Isozaki, Y. Sato, K. Shizume:
Analysis of hepatic GH binding sites of pregnant rabbit crosslinked to ^{125}J-labelled hGH.
FEBS Letters 147, 49 (1982)

303 Tsushima T., H.G. Friesen:
Radioreceptor assay for growth hormone.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 37, 334 (1973)

304 Uthne K.:
Human somatomedins. Purification and some studies on their biological actions.
Acta Endocrinol. 175, 1 (1973)

305 Vecsei P.:
Radioimmunassay
Med. Klin. 73, 497 (1978)

306 Wallis M.:
Pituitary growth hormone.
Nature 281, 633 (1979)

307 Wallis M., H.F. Cadman:
Receptors for somatotropin (GH) and prolactin.
Biochem. Soc. Trans. 9, 33 (1981)

308 Wasteson A., B. Westermark, K. Uthne:
Somatomedin A and B: demonstration of two different somatomedin-like components in human plasma.
Adv. Metab. Disord. 8, 101 (1975)

309 Waters M.J., H.G. Friesen:
Purification and partial characterization of a nonprimate GH receptor.
J. Biol. Chem. 254, 6815 (1979)

310 Waters M.J., H.G. Friesen:
Studies with anti-GH receptor antibodies.
J. Biol. Chem. 254, 6826 (1979)

311 von Werder K.:
Wachstumshormon- und Prolaktinsekretion des Menschen.
Physiologie und Pathophysiologie.
München, Urban & Schwarzenberg (1975)

312 van Wyk J.J., L.E. Underwood, J.B. Baseman, R.L. Hintz, D.R. Clemmons, R.N. Marshall:
Explorations of the insulin-like and growth-promoting properties of somatomedin by membrane receptor assays.
Adv. Metab. Disord. 8, 127 (1975)

313 Yalow R.S., S.A. Berson:
Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.
Nature 184, 1648 (1959)

314 Yalow R.S.:
Heterogeneity of peptide hormones.
Rec. Progr. Horm. Res. 30, 597 (1974)

315 Yalow R.S., K. Hall, R. Luft:
RIA of somatomedin B: application to clinical and physiologic studies.
J. Clin. Invest. 55, 127 (1975)

316 Yokono K., R.A. Roth, S. Baba:
Identification of insulin-degrading enzyme on the surface of cultured human lymphocytes, rat hepatoma cells and primary cultures of rat hepatocytes.
Endocrinology 111, 1102 (1982)

317 Zakin M.M., C. Pena, E. Poskus, J.M. Stewart, A.C. Paladini
Immunological properties of two related fragments from human and equine GHs.
Eur. J. Immunol. 7, 701 (1977)

318 Zapf J., E. Schoenle, M. Waldvogel, I. Sand, E.R. Froesch:
Effect of trypsin treatment of rat adipocytes on biological effects and binding of insulin and insulin-like growth factors: further evidence for the action of insulin-like growth factors through the insulin receptor.
Eur. J. Biochem. 113, 605 (1981)

3. 1. PROTEOHORMON–REZEPTOR–STUDIEN* (Teil 1)

mon	Gewebe	Spezies	Literatur
lin	Leberplasmamembranen	Maus	Kahn 1973
		Kaninchen	Kelly 1974
		Schwein	Kelly 1974
		Ratte	House 1970
			Freychet 1971
			Cuatrecasas 1972
			Clark 1982
	Leberschnitte	Mensch	Carr 1976
	Hepatomzellen	Ratte	Capeau 1982
			Yokono 1982
	Mammaplasmamembranen	Maus	Jnagaki 1982
	Fettzellmembranen	Ratte	Cuatrecasas 1971
	Adipozyten	Ratte	Bennett 1972
			Marshall 1980
			Zapf 1981
	Plazentarzellen	Ratte	Posner 1974
		Mensch	Posner 1974
			Van Buul-Offers 1979
	Fibroblasten	Mensch	Gavin 1972
			Podskalny 1982
	Erythrozyten	Mensch	Elders 1982
			Nakao 1982
	periphere mononukleäre Zellen	Mensch	Archer 1973
			Olefsky 1974
	Monozyten	Mensch	Schwartz 1975
			Bar 1976
			Misbin 1983
	IM–9 Lymphoblastenlinie	Mensch	Gavin 1973
			Gorden 1973
			Gorden 1979
iotensin	Leukozyten	Mensch	Liu 1970
	Uterus, Colon, Blase	Ratte	Liu 1970
	Aorta	Kaninchen	Liu 1970
	Niere, Nebenniere	Rind	Liu 1970
	glatte Muskulatur	Ratte	Douglas 1982
atostatin	Nebennierenrinde	Ratte	Aguilera 1982
kagon	Leberplasmamembranen	Ratte	Tomasi 1970
			Rodbell 1971
			Birnbaumer 1973
			Blundell 1981
			Santos 1982
xin	Myometrium	Ratte	Mercado-Simmen 1982
tocin	Epidermis, Blase	Frosch	Bockaert 1970
H	Testes	Ratte	Bourne 1982
			Conne 1982

TAB. 1. PROTEOHORMON–REZEPTOR–STUDIEN* (Teil 2)

Hormon	Gewebe	Spezies	Literatur
TRH	Hypophyse	Ratte	Hinkle 1975
PRL	Lutealzellen des Ovars	Ratte	Koppelman 1982
	Mammagewebe	Kaninchen	Birkenshaw 1972
	Mammaplasmamembranen	Kaninchen	Shiu 1973
			Djiane 1977
			Friesen 1979
	IM–9 Lymphoblastenlinie	Mensch	Lesniak 1977
	Hepatozyten	Ratte	Ranke 1976
	Lebergewebe	Maus	Posner 1976
			Alhadi 1982
	Leberplasmamembranen	Ratte	Kelly 1974
			Baxter 1981
			Norstedt 1981
		Schwein	Kelly 1974
		Kaninchen	Kelly 1974
		Affe	Posner 1974
		Schaf	Posner 1974
ACTH	Nebennierenrinde	Ratte	Lefkowitz 1970
			Hofmann 1970
			Sayers 1971
TSH	Thyreoideamembranpräparation	Mensch	Shewring 1982
		Rind	Moore 1974
			Buckland 1982
LH–FSH	Hodengewebe	Ratte	Ketelslegers 1975
			Huhtaniemi 1982
HCG	Lutealzellen des Ovars	Ratte	Conn 1978
	Fetale Testes	Mensch	Molsberry 1982

*Radiorezeptorassays und Autoradiographien mit Proteohormonen
Studien mit hGH und GFs werden gesondert aufgeführt.

Tab. 2. REZEPTORSTUDIEN MIT WACHSTUMSFAKTOREN (GFs)

...stumsfaktor	Gewebe	Spezies	Literatur
...in-like factors	Chondrozyten Plazentarzellmembranen	Ratte Mensch	Foley 1982 Van Buul-Offers 1979
...-A	Gefäßendothelien	Mensch Rind	Bar 1981 Bar 1982
...	Gliazellkulturen embryonale Zellen Lunge Fibroblasten	Mensch Maus Nerz Mensch	Heldin 1979 Robinson 1981 Adamson 1981 Shoyab 1981 Ballmer 1981
...	embryonale Neurone Speicheldrüse Ganglien sympathische	Küken Ratte Küken	Harris-Warrick 1980 Riopelle 1981 Costrini 1981 Rohrer 1982
...-A, SM—C	Plazentarzellmembranen IM—9 Lymphoblastenlinie periphere mononukleäre Zellen Leber-, Fettzellmembranen	Mensch Mensch Mensch Ratte	Hall 1974 Hall 1975 Horner 1978 Van Buul-Offers 1979 Chernausek 1981 Kemp 1981 Rosenfeld 1981 Thorsson 1977 Van Wyk 1975

TAB. 3. REZEPTORSTUDIEN MIT MENSCHLICHEM WACHSTUMSHORMON

Gewebe	Spezies	Literatur
Thymozyten	Maus / Ratte	Arrenbrecht 1974
Erythozytenmembranen	Mensch	Sonenberg 1971
Adipozyten	Ratte	Eden 1982 Gavin 1982
Lebergewebe	Maus	Posner 1976
Hepatozyten	Ratte	Ranke 1976 Fix 1981
Leberplasmamembranen	Kaninchen	Tsushima 1973 Guyda 1975 Gottsmann 1976 Herington 1977 Garnier 1977 Garnier 1978 Waters 1979 Cadman 1981 Tsushima 1982
Leberplasmamembranen	Ratte	Herington 1976 Jacobs 1976 Drake 1981 Maes 1982 Hughes 1982 Herington 1982 Chernausek 1982 Baxter 1982
Niere, Milz, Muskel, Gastrointestinal-Trakt	Ratte	Wallis 1981
IM–9 Lymphoblastenlinie	Mensch	Lesniak 1973 Lesniak 1974 Roth 1975 Lesniak 1976 Ranke 1978 Barazzone 1980 Keefer 1981 Hizuka 1982 Eshet 1982
periphere mononukleäre Zellen	Mensch	Gavin 1972 Gorden 1973 Eshet 1975 Hinterberger 1976
REZEPTORSTUDIEN MIT HGH–FRAGMENTEN UND – KOMPONENTEN		
Leberplasmamembranen	Mensch Ratte Kaninchen	Soman 1975 Moore 1978 Sigel 1981 Soman 1977 Moore 1977
IM–9 Lymphoblastenlinie	Mensch	Gorden 1973

TAB. 4. WACHSTUMSFAKTOREN (growth factors)*

Vorläufige Bezeichnung	Wirkung	Literatur
Epidermal growth factor	morphologische Rundung von epidermoid-Zellen	Chinkers et al. 1981
Fibroblast growth factor	Proteinumsatzsteigerung in Guinea-Pig-Glomerulum-zellen	Oberley et. al. 1981
Platelet-derived growth factor		Golde et al. 1980
Multiplication-stimulating activity	Zellvermehrung, Stimulation der DNA-Synthese in 3T3-Zellen	Nissley et al. 1977
Nerve growth factor	morphologische Pseudopodienbildung bei Phäochromozytomzellen	Rieske et al. 1981
Insulin-like growth factors I, II	Proliferation von menschlichen Muskelzellen	Pfeifle et al. 1981
Pituitary derived peptides	Stimulation der DNA-Synthese in Fibroblasten	Kelly & Puett 1981
Nonsuppressible insulin-like activity		Phillips et al. 1980
Haematopoietic-stimulating factors (erythropoietin, lymphopoietins etc.)	Koloniebildung, Knochenmarkstimulation etc.	Golde et al. 1980

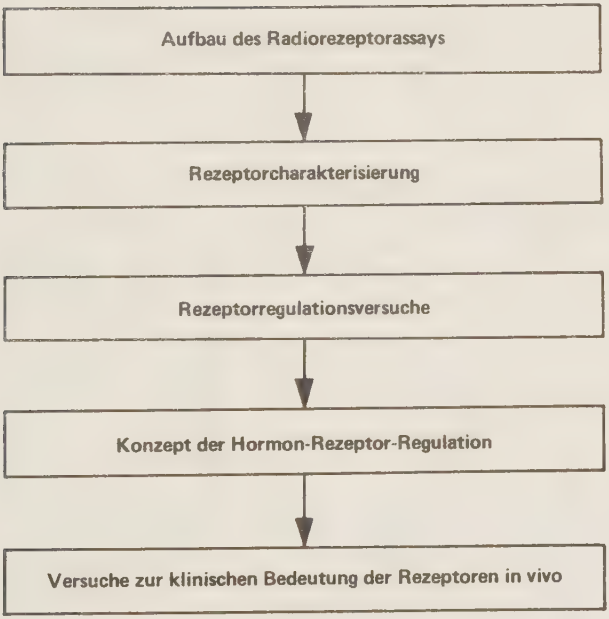
*Insulin, GH, die Somatomedine A1, A2, B, C und die SM-carrier proteins werden im Text ausführlicher behandelt und sind deshalb nicht aufgeführt.

TAB. 5. PATHOLOGIE DES WACHSTUMSHORMONS

Pathologisches Bild	Zusammenhang mit Wachstumshormon*	Literatur
WACHSTUMSSTÖRUNGEN	gesichert	Bierich 1980, 198 Butenandt 1974 Marshall 1977
Akromegalie	gesichert	Lawrence 1970 Neeb 1979
Hypophysärer Zwergwuchs	gesichert	Butenandt 1978 Ranke 1979
GH-Resistenz	gesichert	Hayek 1978 Laron 1981
Anti-hGH-Antikörper	gesichert	Underwood 1974 Bundesen 1981
Unterernährung	vermutet	Whitten 1969 Hintz 1978
Autoimmun-Rezeptorerkrankung	gesichert	Drachman 1979 Evered 1982
Ullrich-Turner-Syndrom	vermutet	Butenandt 1980 Bottazzo 1980
Juvenile rheumatoide Arthritis	vermutet	Butenandt 1979
MALIGNE ERKRANKUNGEN		
Hypophysentumoren	gesichert	Guyda 1973 Bucher 1982
Akute Lymphoblastenleukose	vermutet	Rogers 1977 Mercola 1981
Endometriumcarcinom	vermutet	Ayalon 1982
Chondrosarkom (Tierexperiment)	gesichert	McCumbee 1981
Systemische Tumortherapie	vermutet	Shalet 1981
INFEKTIONSKRANKHEITEN		
Verlauf von Hepatitiden	vermutet	Becker 1969
Verlauf von Virusinfekten	vermutet	Beisel 1968
VERSCHIEDENE		
Psoriasis	vermutet	Koebberling 1981
Endogene Depression	vermutet	Linkowski 1980
Immundefekt-Syndrome	vermutet	Ammann 1970

*Ursache, Folge, ungeklärte Begleiterscheinung des Krankheitsbildes

TAB. 6. FLUSSDIAGRAMM 'VERSUCHSAUFBAU'



TAB. 7. BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN LEBENDEN ZELLEN UND VORBEHANDELTEN, TOTEN ZELLEN

	I Unbehandelte Zellen (lebend)	II Ultrazentrifugierte Zellen	III Tiefgefrorene Zellen
Bindungsparameter:	Bindungsparameter		
Total Binding	8.5 ± 0.4 %	8.5 ± 0.3 %	3.2 ± 0.2 %
Specific Binding	4.3 ± 0.5 %	0	0
Unspecific Binding	4.2 ± 0.4 %	8.5 ± 0.3 %	3.2 ± 0.2 %
% verdrängbar '25'	51 ± 3 %	0	0
Zellmorphologie (mikroskopisch)			
Trypanblaufärbung	98 % negativ	80 % leicht gefärbt	80 % leicht gefärbt
Zellform	rund-lymphoid	länglich-ovaloid	sternförmig-gezipfelt

Mittelwerte von drei unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 8. BINDUNG VON BIG- UND LITTLE-hGH-TRACER AN MONONUKLEÄREN ZELLEN – VERDRÄNGUNGSPARAMETER VON LITTLE-hGH IN ABHÄNGIGKEIT VOM TRACERALTER*

I. Little-hGH-Tracer

	Alter unter 1 Woche	Alter unter 3 Wochen	Alter über 4 Wochen
Regressionskoeffizient	– 0.98	– 0.96	– 0.97
Assoziationskonstante [M^{-1}]	2.2×10^{9}	1.6×10^{9}	1.9×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	5.5×10^{-11}	4.5×10^{-11}	4.5×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	5 500	4 500	4 500
Total Binding	10.3 %	9.0 %	7.5 %
Specific Binding	5.6 %	4.5 %	3.9 %
Unspecific Binding	4.8 %	4.5 %	3.6 %
% verdrängbar '25'	54 %	50 %	52 %

* Mittelwerte von fünf unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 8. BINDUNG VON BIG UND LITTLE hGH TRACER AN MONONUKLEAREN ZELLEN – VERDRÄNGUNGSPARAMETER VON LITTLE-hGH IN ABHÄNGIGKEIT VOM TRACERALTER*

II. Big hGH Tracer

	Alter unter 1 Woche	Alter unter 3 Wochen	Alter über 4 Wochen
Regressionskoeffizient	– 0.93	– 0.91	– 0.92
Assoziationskonstante [M^{-1}]	0.6×10^{9}	0.4×10^{9}	0.6×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	39.5×10^{-11}	31.5×10^{-11}	11.6×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	39 500	31 500	11 600
Total Binding	14.8 %	11.1 %	6.7 %
'Specific' Binding**	3.0 %	2.5 %	2.0 %
'Unspecific' Binding	11.8 %	8.4 %	4.6 %
% verdrängbar '25'	20 %	23 %	30 %

* Mittelwerte von fünf unabhängigen Doppelbestimmungen

** 'Specific' bedeutet hier: durch Little-hGH verdrängbar

TAB. 9. BINDUNGSPARAMETER BEI BINDUNG VON VERSCHIEDENEN ^{125}J-hGH-FRAKTIONEN DER MARKIERUNGSRECHROMATOGRAPHIEN BEI VERDRÄNGUNG MIT LITTLE-hGH (CRESCORMON^{R})*

	Big-hGH-Fraktionen	Little-hGH-Fraktionen
Regressionskoeffizient	− 0.78 bis − 0.88	− 0.91 bis − 0.95
Assoziationskonstante [M^{-1}]	0.07×10^{9} bis 0.14×10^{9}	1.4×10^{9} bis 1.8×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	112×10^{-11} bis 114×10^{-11}	4.1×10^{-11} bis 7.3×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	120 000 bis 114 000	4 100 bis 7 300
Total Binding	8.7 bis 16.1 %	7.3 bis 10.0 %
Specific Binding**	1.8 bis 3.7 %	4.3 bis 6.0 %
Unspecific Binding	6.9 bis 12.5 %	3.1 bis 4.0 %
% verdrängbar '25'	21 bis 23 %	53 bis 60 %

* sechs Rechromatographieprofile mit bis zu sechs verschiedenen Fraktionen wurden in den Assays eingesetzt

** Specific Binding bedeutet hier: durch Little-hGH (Crescormon^{R}) verdrängbar

TAB. 10. CHARAKTERISTIKA ZWEIER MARKIERUNGSTECHNIKEN FÜR hGH MITTELS ^{125}J

	Chloramine-T-Methode	LPO-Methode
Prinzip	chemisches Oxidans	enzymatische Oxidation
Nachteil	relativ hohe Rate von oxidativen Veränderungen an Proteinmolekülen	kaum Angaben über Zahl der eingeführten Moleküle pro Hormonmolekül
Vorteil	Schnell und einfach durchzuführen	Angeblich wird das immunologische Verhalten des Hormons nicht beeinflußt
Literatur zur Methodik	Hunter 1962 Greenwood 1963 Hunter 1964	Morrison 1963 Thorell 1971 Miyachi 1973
Bindungsparameter*		
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.4×10^{9}	1.5×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	6.4×10^{-11}	5.7×10^{-11}
Total Binding	8.7 %	8.7 %
Specific Binding	4.6 %	4.8 %
Unspecific Binding	4.0 %	3.8 %
% verdrängbar '25'	53 %	56 %

*Mittelwerte von drei unabhängigen Dreifachbestimmungen

TAB. 11. RE–EXPRESSION DER REZEPTOREN IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZEITINTERVALL ZWISCHEN ZELLSEPARATION UND BINDUNGSASSAY*

	sofort nach Separation	2 h nach Separation	4 h nach Separation	8 h nach Separation
Regressionskoeffizient	– 0.90	– 0.90	– 0.92	– 0.94
Assoziationskonstante [M^{-1}]	0.3×10^{9}	0.7×10^{9}	1.6×10^{9}	1.9×10^{9}
MBK [M/10^{6} Zellen]	13.0×10^{-11}	10.8×10^{-11}	5.7×10^{-11}	5.8×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	13 000	10 800	5 700	5 800
Total Binding	3.9 %	6.0 %	10.3 %	10.4 %
Specific Binding	1.0 %	2.3 %	6.2 %	6.3 %
Unspecific Binding	2.9 %	3.7 %	4.1 %	4.1 %
% verdrängbar '25'	26 %	38 %	61 %	60 %

TAB. 11. RE–EXPRESSION DER REZEPTOREN IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZEITINTERVALL ZWISCHEN ZELLSEPARATION UND BINDUNGSASSAY*

	16 h nach Separation	24 h nach Separation	32 h nach Separation
Regressionskoeffizient	– 0.92	– 0.92	–0.88
Assoziationskonstante [M^{-1}]	2.0×10^{9}	1.8×10^{9}	0.5×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	5.4×10^{-11}	5.8×10^{-11}	7.4×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	5 400	5 800	7 400
Total Binding	10.5 %	10.1 %	4.7 %
Specific Binding	6.2 %	6.0 %	1.6 %
Unspecific Binding	4.3 %	4.1 %	3.1 %
% verdrängbar '25'	59 %	59 %	34 %

*Mittelwerte von sechs Doppelbestimmungen

	4 °C	20 °C	30 °C	37 °C	40 °C
Regressionskoeffizient	– 0.93	– 0.92	– 0.95	–0.93	– 0.92
Assoziationskonstante [M^{-1}]	0.5×10^{9}	0.9×10^{9}	1.6×10^{9}	1.8×10^{9}	0.8×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	4.9×10^{-11}	4.5×10^{-11}	4.5×10^{-11}	5.9×10^{-11}	12.4×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	4 900	4 500	4 500	5 900	12 400
Total Binding	4.1 %	5.7 %	7.7 %	11.1 %	10.5 %
Specific Binding	1.0 %	2.2 %	4.0 %	5.8 %	3.5 %
Unspecific Binding	3.1 %	3.5 %	3.7 %	5.3 %	7.0 %
% verdrängbar '25'	24 %	39 %	51 %	52 %	33 %

*Mittelwerte von drei unabhängigen Dreifachbestimmungen

TAB. 13. INTRAPERSONALASSAYS DER ^{125}J-hGH BINDUNG AN LYMPHOZYTEN*

I. Gesunde weibliche Versuchsperson, 23 Jahre

	Tracereinsatz 11 000 cpm	Tracereinsatz 22 000 cpm
Regressionskoeffizient	– 0.94	– 0.95
Assoziationskonstante [M^{-1}]	$1.8 \times 10^9 \pm 0.3 \times 10^9$	$1.5 \times 10^9 \pm 0.2 \times 10^9$
MBK [$M/10^6$ Zellen]	$10.3 \times 10^{-11} \pm 1.5 \times 10^{-11}$	$8.9 \times 10^{-11} \pm 1.1 \times 10^{-11}$
Bindungsstellen pro Zelle	10 300 ± 1 500	8 900 ± 1 100
Total Binding	15.5 ± 1.5 %	13.0 ± 1.8 %
Specific Binding	9.4 ± 0.6 %	7.5 ± 1.2 %
Unspecific Binding	6.1 ± 0.9 %	5.5 ± 0.6 %
% verdrängbar '25'	61 %	58 %
Variationskoeffizient Total Binding	10 %	14 %

TAB. 13. INTRAPERSONALASSAYS DER ^{125}J-hGH BINDUNG AN LYMPHOZYTEN*

II. Gesunde männliche Versuchsperson, 25 Jahre

	Tracereinsatz 11 000 cpm	Tracereinsatz 22 000 cpm
Regressionskoeffizient	− 0.97	− 0.93
Assoziationskonstante [M^{-1}]	$1.7 \times 10^9 \pm 0.3 \times 10^9$	$1.4 \times 10^9 \pm 0.3 \times 10^9$
MBK [M/10^6 Zellen]	$6.8 \times 10^{-11} \pm 0.4 \times 10^{-11}$	$5.4 \times 10^{-11} \pm 1.1 \times 10^{-11}$
Bindungsstellen pro Zelle	6 800 ± 400	5 400 ± 1 100
Total Binding	11.1 ± 1.6 %	9.0 ± 0.9 %
Specific Binding	6.7 ± 1.3 %	5.8 ± 0.5 %
Unspecific Binding	4.4 ± 0.2 %	3.2 ± 0.5 %
% verdrängbar '25'	60 %	64 %
Variationskoeffizient Total Binding	14 %	10 %

*bei I : Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen
bei II: Mittelwerte und Standardabweichungen von 14 unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 14. BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN VERSCHIEDENEN REZEPTOR–TRAGENDEN SYSTEMEN *

	Lebermembranen (Kaninchen)	Lebermembranen (Kaninchen, schwanger)	Mammamembranen (Kaninchen, schwanger)	Lymphozyten (Mensch)
Regressionskoeffizient	– 0.93	– 0.93	– 0.92	– 0.96
Assoziationskonstante [M^{-1}]	3.7×10^9	3.9×10^9	4.6×10^9	1.8×10^9
MBK [fM/mg bzw. M/10^6 Zellen]	26	55	12	6.4
Total Binding	26.6 %	37.9 %	13.6 %	10.0 %
Specific Binding	22.0 %	31.1 %	10.0 %	5.9 %
Unspecific Binding	4.6 %	6.8 %	3.6 %	4.1 %
% verdrängbar '25'	83 %	83 %	74 %	59 %

*Mittelwerte von drei unabhängigen Dreifachbestimmungen

TAB. 15. BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN ZIRKULIERENDEN BLUTZELLEN GESUNDER PROBANDEN*

	mononukleäre Zellen Ficollseparation	Erythrozyten	Granulozyten	Milz-Lymphozyten**
Regressionskoeffizient	– 0.91	– 0.80	– 0.78	– 0.91
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.8×10^{9}	0.04×10^{9}	ϕ	0.5×10^{9}
MBK [M/10^6 Zellen]	5.7×10^{-11}	ϕ	ϕ	12.5×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	5 700	ϕ	ϕ	12 500
Total Binding	10.9 %	4.4 %	8.4 %	6.7 %
Specific Binding	5.8 %	0.2 %	0.1 %	1.9 %
Unspecific Binding	5.1 %	4.2 %	ϕ	4.8 %
% verdrängbar '25'	53 %	5 %	ϕ	28 %

* Mittelwerte von fünf unabhängigen Doppelbestimmungen
**Mittelwerte von einer Dreifachbestimmung

TAB. 16. ^{125}J-hGH-BINDUNG AN MONONUKLEÄREN, ZIRKULIERENDEN ZELLEN GESUNDER PROBANDEN*

	mononukleäre Zellen Ficollseparation	Monozyten	Lymphozyten ohne Monozyten
Regressionskoeffizient	– 0.90	– 0.89	– 0.87
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.7×10^{9}	0.5×10^{9}	1.6×10^{9}
MBK [M/10^{6} Zellen]	4.8×10^{-11}	44.0×10^{-11}	9.8×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	4 800	44 000	9 800
Total Binding	8.2 %	18.6 %	12.7 %
Specific Binding	4.2 %	4.9 %	7.6 %
Unspecific Binding	4.0 %	13.8 %	5.1 %
% verdrängbar '25'	51 %	26 %	60 %

*Mittelwerte von drei unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 17. BINDUNG VON ^{125}J-hHG AN LYMPHOBLASTENKULTUREN*

	mononukleäre Zellen Ficollseparation	K–562–Zellen	PDe–B–1–Zellen
Regressionskoeffizient	– 0.98	– 0.87	– 0.97
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.7×10^{9}	0.5×10^{9}	1.1×10^{9}
MBK [M/10^{6} Zellen]	5.9×10^{-11}	11.0×10^{-11}	10.0×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	5 900	11 000	10 000
Total Binding	9.5 %	5.9 %	11.0 %
Specific Binding	4.8 %	1.6 %	5.1 %
Unspecific Binding	4.7 %	4.3 %	6.0 %
% verdrängbar '25'	51 %	27 %	46 %

* Mittelwerte von drei unabhängigen Dreifachbestimmungen

TAB. 18. BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN LYMPHOBLASTENKULTUREN*

	PHA – Blasten**	Con A – Blasten***
Regressionskoeffizient	– 0.95	– 0.88
Assoziationskonstante [M^{-1}]	2.3×10^{9}	0.24×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	18.4×10^{-11}	20.8×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	18 400	20 800
Total Binding	28.7 %	5.2 %
Specific Binding	16.6 %	0.8 %
Unspecific Binding	12.1 %	4.5 %
% verdrängbar '25'	58 %	14 %

* Mittelwerte von vier unabhängigen Doppelbestimmungen
** vier Tage Inkubation mit 12 ug PHA
***vier Tage Inkubation mit 32 ug Con A

TAB. 19. ^{125}J-hGH-BINDUNG AN T-LYMPHOZYTENPOPULATIONEN GESUNDER PROBANDEN*

	mononukleäre Zellen Ficollseparation	Nylon-I-Fraktion sofort	Nylon-I-Fraktion nach 8 h
Regressionskoeffizient	– 0.95	– 0.86	– 0.96
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.8×10^{9}	0.3×10^{9}	3.6×10^{9}
MBK [M/10^{6} Zellen]	5.6×10^{-11}	33.7×10^{-11}	5.5×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	5 600	33 700	5 500
Total Binding	11.1 %	8.9 %	15.7 %
Specific Binding	5.6 %	1.7 %	11.4 %
Unspecific Binding	5.5 %	7.2 %	4.2 %
% verdrängbar '25'	51 %	19 %	73 %

* Mittelwerte von zwei unabhängigen Dreifachbestimmungen
** Mittelwerte einer Dreifachbestimmung

TAB. 19. ^{125}J-hGH-BINDUNG AN T-LYMPHOZYTEN-POPULATIONEN GESUNDER PROBANDEN*

	Nylon-II-Fraktion nach 8 h**
Regressionskoeffizient	– 0.87
Assoziationskonstante [M^{-1}]	0.5×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	8.0×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	8 000
Total Binding	5.8 %
Specific Binding	2.1 %
Unspecific Binding	3.8 %
% verdrängbar '25'	36 %

* Mittelwerte von zwei unabhängigen Dreifachbestimmungen
**Mittelwerte einer Dreifachbestimmung

TAB. 20. BINDUNGSPARAMETER VON VERDRÄNGUNGSKURVEN HYPOTHALAMISCHER PEPTIDHORMONE FÜR AN MONONUKLEÄRE ZELLEN GEBUNDENES ^{125}J-hGH*

	hGH	Oxytocin	LH–RH	TRH
Regressionskoeffizient	– 0.95	– 0.85	– 0.76	– 0.75
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.8×10^{9}	0.0009×10^{9}	0.0001×10^{9}	0.001×10^{9}
MBK [M/10^{6} Zellen]	4.7×10^{-11}	10×10^{-6}	ϕ	ϕ
Bindungsstellen pro Zelle	4 700	ϕ	ϕ	ϕ
Total Binding	9.3 %	9.4 %	8.9 %	9.2 %
Specific Binding	5.2 %	ϕ	ϕ	ϕ
Unspecific Binding	4.1 %	ϕ	ϕ	ϕ
% verdrängbar '25'	56 %	ϕ	ϕ	ϕ

*Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 21. BINDUNGSPARAMETER VON VERDRÄNGUNGSKURVEN HYPOPHYSÄRER PROTEOHORMONE FÜR AN MONONUKLEÄRE ZELLEN GEBUNDENES ^{125}J-hGH*

	hGH	PRL	LH–FSH	TSH
Regressionskoeffizient	– 0.95	– 0.90	– 0.93	– 0.94
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.8×10^{9}	0.1×10^{9}	0.05×10^{9}	0.07×10^{9}
MBK [M/10^{6} Zellen]	4.7×10^{-11}	85.2×10^{-11}	202×10^{-11}	157×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	4 700	85 200	202 000	157 000
Total Binding	9.3 %	9.3 %	9.3 %	9.2 %
Specific Binding	5.2 %	0.9 %	ϕ	ϕ
Unspecific Binding	4.1 %	8.4 %	ϕ	ϕ
% verdrängbar '25'	56 %	10 %	ϕ	ϕ

*Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 22. BINDUNGSPARAMETER VON VERDRÄNGUNGSKURVEN VON PROTEOHORMONEN FÜR AN MONONUKLEÄRE ZELLEN GEBUNDENES ^{125}J-hGH*

	hGH	hCG	Insulin
Regressionskoeffizient	– 0.95	– 0.93	– 0.92
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.8×10^{9}	0.09×10^{9}	0.007×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	4.7×10^{-11}	189×10^{-11}	146×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	4 700	189 000	146 000
Total Binding	9.3 %	9.7 %	9.4 %
Specific Binding	5.2 %	ϕ	ϕ
Unspecific Binding	4.1 %	ϕ	ϕ
% verdrängbar '25'	56 %	ϕ	ϕ

*Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 23. BINDUNGSPARAMETER VON ^{125}J-hGH BEI VERDRÄNGUNG MIT VERSCHIEDENEN hGH-PRÄPARATIONEN*

	Hampstead Referenzpräparation	Crescormon^{R}	Grorm^{R}
Regressionskoeffizient	– 0.96	– 0.95	– 0.97
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.8×10^{9}	1.8×10^{9}	1.8×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	5.1×10^{-11}	4.7×10^{-11}	4.9×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	5 100	4 700	4 900
Total Binding	9.1 %	9.3 %	9.6 %
Specific Binding	5.1 %	5.2 %	5.1 %
Unspecific Binding	4.0 %	4.1 %	4.5 %
% verdrängbar '25'	56 %	56 %	53 %

*Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 2 3. BINDUNGSPARAMETER VON ^{125}J-hGH BEI VERDRÄNGUNG MIT VERSCHIEDENEN HGH–PRÄPARATIONEN*

	Nanormon^{R}	Kabi-Synthetisch
Regressionskoeffizient	– 0.95	– 0.96
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.7×10^{9}	2.1×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	5.6×10^{-11}	4.0×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	5 600	4 000
Total Binding	9.2 %	9.2 %
Specific Binding	4.9 %	5.5 %
Unspecific Binding	4.3 %	3.8 %
% verdrängbar '25'	53 %	60 %

* Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 24. BINDUNG VON ^{125}J-hGH IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORINKUBATIONSDAUER*

	ohne Vorinkubation	30 Min. Vorinkubation	60 Min. Vorinkubation
Regressionskoeffizient	– 0.91	– 0.91	–0.90
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.7×10^{9}	1.7×10^{9}	1.2×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	4.4×10^{-11}	12.6×10^{-11}	13.4×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	4 400	12 600	13 700
Total Binding	8.4 %	14.1 %	9.7 %
Specific Binding	5.0 %	8.8 %	5.0 %
Unspecific Binding	3.4 %	5.3 %	4.7 %
% verdrängbar '25'	60 %	62 %	52 %

*Mittelwerte von zwei unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 24. BINDUNG VON ^{125}J-hGH IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORINKUBATIONSDAUER*

	120 Min. Vorinkubation	240 Min. Vorinkubation
Regressionskoeffizient	– 0.89	– 0.88
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.1×10^{9}	0.4×10^{9}
MBK [M/10^{6} Zellen]	5.0×10^{-11}	5.6×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	5 000	5 600
Total Binding	7.7 %	4.7 %
Specific Binding	2.9 %	1.6 %
Unspecific Binding	4.8 %	3.1 %
% verdrängbar '25'	38 %	33 %

*Mittelwerte von zwei unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 25. BINDUNG VON ^{125}J-hGH IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORINKUBATION MIT PROTEOHORMONEN*

	ohne Hormon	mit 25ng hGH	mit 100ng hGH
Regressionskoeffizient	– 0.87	– 0.90	–0.89
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.3×10^{9}	0.6×10^{9}	0.5×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	5.6×10^{-11}	6.2×10^{-11}	3.2×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	5 600	6 200	3 200
Total Binding	6.9 %	4.5 %	4.1 %
Specific Binding	3.3 %	1.3 %	1.0 %
Unspecific Binding	3.5 %	3.2 %	3.0 %
% verdrängbar '25'	48 %	27 %	24 %

*Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 25 . BINDUNG VON ^{125}J-hGH IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORINKUBATION MIT PROTEOHORMONEN*

	mit 25ng PRL	mit 20ng Insulin	mit 25ng Dexamethason
Regressionskoeffizient	– 0.90	– 0.92	–0.91
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.3×10^{9}	1.4×10^{9}	1.3×10^{9}
MBK [M/10^{6} Zellen]	4.4×10^{-11}	11.4×10^{-11}	5.0×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	4 400	11 400	5 000
Total Binding	6.2 %	12.9 %	7.0 %
Specific Binding	3.2 %	6.4 %	3.5 %
Unspecific Binding	3.0 %	6.5 %	3.5 %
% verdrängbar '25'	52 %	50 %	50 %

*Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 26. BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN LYMPHOZYTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORINKUBATION MIT ANTITRYPSIN*

	mit 1 000 KIE Antitrypsin	mit ca. 10ng Trypsin	mit ca. 10ng Trypsin und 1 000 KIE Antitrypsin
Regressionskoeffizient	– 0.93	– 0.86	–0.93
Assoziationskonstante [M^{-1}]	3.6×10^{9}	0.5×10^{9}	1.9×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	7.4×10^{-11}	6.4×10^{-11}	6.0×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	7 400	6 400	6 000
Total Binding	17.1 %	4.7 %	9.5 %
Specific Binding	12.4 %	1.4 %	5.3 %
Unspecific Binding	4.7 %	3.3 %	4.2 %
% verdrängbar '25'	73 %	30 %	56 %

*Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 2 6$_4$ BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN LYMPHOZYTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORINKUBATION MIT ANTITRYPSIN*

	ohne Antitrypsin	mit 10 KIE Antitrypsin	mit 100 KIE Antitrypsin
Regressionskoeffizient	– 0.91	– 0.92	–0.92
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.5×10^9	1.9×10^9	2.4×10^9
MBK [M/10^6 Zellen]	6.3×10^{-11}	7.0×10^{-11}	7.7×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	6 300	7 000	7 700
Total Binding	8.7 %	10.2 %	12.6 %
Specific Binding	4.5 %	6.0 %	8.3 %
Unspecific Binding	4.2 %	4.2 %	4.3 %
% verdrängbar '25'	52 %	59 %	66 %

*Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 27. BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN LYMPHOZYTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ANTITRYPSIN-KONZENTRATION IM INKUBATIONSMEDIUM*

	ohne Antitrypsin	mit 10 KIE Antitrypsin	mit 100 KIE Antitrypsin
Regressionskoeffizient	– 0.95	– 0.94	–0.90
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.7×10^{9}	2.3×10^{9}	2.7×10^{9}
MBK [M/10^{6} Zellen]	6.0×10^{-11}	5.5×10^{-11}	6.1×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	6 000	5 500	6 100
Total Binding	10.3 %	12.7 %	15.9 %
Specific Binding	5.6 %	7.8 %	11.2 %
Unspecific Binding	4.7 %	4.9 %	4.7 %
% verdrängbar '25'	54 %	61 %	70 %

*Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 27. BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN LYMPHOZYTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ANTITRYPSIN-KONZENTRATION IM INKUBATIONSMEDIUM*

	mit 1 000 KIE Antitrypsin	mit 10 000 KIE Antitrypsin
Regressionskoeffizient	– 0.94	– 0.95
Assoziationskonstante [M^{-1}]	3.4×10^{9}	2.9×10^{9}
MBK [M/10^{6} Zellen]	6.3×10^{-11}	8.3×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	6 300	8 300
Total Binding	19.7 %	19.5 %
Specific Binding	14.4 %	13.6 %
Unspecific Binding	5.3 %	5.9 %
% verdrängbar '25'	73 %	70 %

*Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 27. BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN LYMPHOZYTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ANTITRYPSIN-KONZENTRATION IM INKUBATIONSMEDIUM*

	mit ca. 10ng Trypsin	mit 1 000 KIE Antitrypsin und ca. 10ng Trypsin
Regressionskoeffizient	– 0.88	– 0.94
Assoziationskonstante [M^{-1}]	0.6×10^{9}	1.8×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	2.8×10^{-11}	5.4×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	2 800	5 400
Total Binding	2.9 %	10.6 %
Specific Binding	1.0 %	6.0 %
Unspecific Binding	1.9 %	4.6 %
% verdrängbar '25'	31 %	57 %

*Mittelwerte von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 28. HGH–BINDUNG NACH VORINKUBATION MIT SM–B UND ANTI–SM–B–ANTISERUM*

	Kontrolle ohne Zusatz	100ng SM–B	1 000ng SM–B
Regressionskoeffizient	– 0.93	– 0.90	–0.95
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.7×10^{9}	2.8×10^{9}	12.0×10^{9}
MBK [$M/10^{6}$ Zellen]	5.4×10^{-11}	5.4×10^{-11}	6.4×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	5 400	5 400	6 400
Total Binding	9.6 %	11.6 %	16.2 %
Specific Binding	5.2 %	6.2 %	9.7 %
Unspecific Binding	4.4 %	5.4 %	6.5 %
% verdrängbar '25'	54 %	53 %	60 %

*Mittelwerte von zwei unabhängigen Dreifachbestimmungen

TAB. 2 8 . HGH–BINDUNG NACH VORINKUBATION MIT SM–B UND ANTI–SM–B–ANTISERUM*

	1000ng SM–B & anti–SM–B 10^{-5}	anti–SM–B 10^{-3}	anti–SM–B 10^{-2}
Regressionskoeffizient	– 0.93	– 0.92	–0.88
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.6×10^{9}	1.0×10^{9}	0.05×10^{9}
MBK [M/10^{6} Zellen]	4.8×10^{-11}	5.3×10^{-11}	7.2×10^{-11}
Bindungsstellen pro Zelle	4 800	5 300	7 200
Total Binding	8.3 %	6.6 %	5.1 %
Specific Binding	4.1 %	2.4 %	1.1 %
Unspecific Binding	4.2 %	4.2 %	4.0 %
% verdrängbar '25'	49 %	36 %	22 %

*Mittelwerte von zwei unabhängigen Dreifachbestimmungen

TAB. 2 9 . MITOGENINDUZIERTE LYMPHOBLASTENTRANSFORMATION UND ^{125}J-hGH-BINDUNG AN LYMPHOBLASTEN*

nach vier Tagen Inkubation:

	Total Binding	TdR-Einbau
Lymphozyten ohne Mitogen	10.2 ± 1.5 %	350 ± 130 cpm
Lymphoblasten mit 5 ug PHA	13.0 ± 1.6 %	29 950 ± 2 240 cpm
Lymphoblasten mit 12 ug PHA	34.1 ± 4.1 %	74 300 ± 2 070 cpm
Lymphoblasten mit 25 ug PHA	22.9 ± 3.0 %	100 150 ± 5 860 cpm
Lymphoblasten nach 8 ug Con A	10.9 ± 1.7 %	61 150 ± 1 000 cpm
Lymphoblasten nach 32 ug Con A	6.0 ± 0.6 %	53 300 ± 1 100 cpm

*Mittelwerte und Standardabweichungen von acht unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 30 . MITOGENINDUZIERTE LYMPHOBLASTENTRANSFORMATION UND ^{125}J-hGH-BINDUNG AN LYMPHOBLASTEN*

nach sieben Tagen Inkubation:

	Total Binding	TdR-Einbau
Lymphozyten ohne Mitogen	9.1 ± 1.6 %	490 ± 140 cpm
Lymphoblasten nach 25 ug PHA	23.2 ± 2.2 %	58 300 ± 1 980 cpm
Lymphoblasten nach 32 ug Con A	5.0 ± 0.5 %	31 600 ± 1 200 cpm

*Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs unabhängigen Doppelbestimmungen

TAB. 3 1. BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN MONONUKLEÄREN ZELLEN VERSCHIEDENER PROBANDENGRUPPEN*

	Assoziations-konstante **	Max. Bindungs-Kapazität ***	% verdrängbar '25'	Total Binding	Specific Binding
Gesamt N = 104	1.6×10^{9} (34 %)	9.2×10^{-11} (45 %)	50 % (15 %)	11.9 % (36 %)	6.2 % (46 %)
Gesunde Probanden N = 72	1.5×10^{9} (14 %)	7.1×10^{-11} (29 %)	51 % (7 %)	10.0 % (21 %)	5.1 % (23 %)
Akromegalie N = 4	1.4×10^{9} (89 %)	20.9×10^{-11} (15 %)	37 % (12 %)	12.3 % (8 %)	4.5 % (17 %)
HGH-Mangel ohne Therapie N = 12	2.1×10^{9} (16 %)	12.5×10^{-11} (24 %)	56 % (5 %)	19.1 % (14 %)	10.5 % (16 %)
HGH-Mangel mit Therapie N = 9	0.9×10^{9} (18 %)	12.1×10^{-11} (10 %)	36 % (12 %)	10.2 % (8 %)	3.6 % (15 %)
ALL N = 7	2.2×10^{9} (50 %)	14.3×10^{-11} (18 %)	61 % (16 %)	20.4 % (21 %)	12.3 % (22 %)

*Mittelwerte und zugehörige Variationskoeffizienten (in Klammern)

** [M^{-1}]

*** [$M/10^{6}$ cells]

TAB. 32 . BINDUNG VON ^{125}J-hGH AN MONONUKLEÄREN ZELLEN GESUNDER PROBANDEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM GESCHLECHT*

	Gesamt N = 72	Männlich N = 44	Weiblich N = 28	Signifikanzniveau (männlich gegen weiblich)
Alter (Jahre)**	33.4 ± 20.9	37.6 ± 22.4	26.8 ± 16.7	p 0.01
Assoziationskonstante [M^{-1}]	1.5 x 10^{9} (14 %)	1.6 x 10^{9} (14 %)	1.5 x 10^{9} (14 %)	nicht signifikant
MBK [M/10^{6} Zellen]	7.1 x 10^{-11} (29 %)	6.0 x 10^{-11} (27 %)	8.9 x 10^{-11} (15 %)	p 0.0001
Total Binding %	10.0 (21 %)	8.8 (13 %)	11.8 (12 %)	p 0.0001
Specific Binding %	5.1 (23 %)	4.4 (14 %)	6.1 (17 %)	p 0.0001
Unspecific Binding %	5.0 (21 %)	4.3 (17 %)	5.8 (10 %)	p 0.0001
% verdrängbar '25'	51 (8 %)	50 (9 %)	51 (6 %)	nicht signifikant

* Mittelwerte von N Probanden mit Variationskoeffizienten (in Klammern)
**Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Gruppe

TAB. 33. ASSOZIATIONSKONSTANTEN* FÜR DIE ^{125}J-hGH-BINDUNG AN MONONUKLEÄREN ZELLEN VON PATIENTEN MIT hGH-MANGEL.

Patient	Alter	Therapieschema (je hGH/Woche)	Assoziationskonstante nach Therapiepause	Assoziationskonstante unter Therapie
weiblich:				
G.S.	12 Jahre	2 x 4 IE	2.8×10^9 M^{-1}	0.8×10^9 M^{-1}
K.C.	16 Jahre	3 x 4 IE	2.3×10^9 M^{-1}	0.8×10^9 M^{-1}
männlich:				
S.G.	10 Jahre	3 x 4 IE	2.9×10^9 M^{-1}	0.9×10^9 M^{-1}
M.H.	8 Jahre	3 x 4 IE	1.9×10^9 M^{-1}	0.9×10^9 M^{-1}
E.D.	16 Jahre	3 x 4 IE	2.0×10^9 M^{-1}	1.0×10^9 M^{-1}
S.D.	16 Jahre	3 x 4 IE	2.1×10^9 M^{-1}	0.8×10^9 $M^{-1}1$

*Berechnete Werte von Dreifachassays

TAB. 34. RADIOREZEPTORASSAY MIT MONONUKLEÄREN ZELLEN – STANDARDANSATZSCHEMA

	Tris–Assaypuffer	Zellsuspension mit 10^6 Zellen	Tracer	Standard	Gesamtvolumen
B_O*	800 µl	100 µl	100 µl	–	1000 µl
Standard**	700 µl	100 µl	100 µl	100 µl	1000 µl
Leerkontrolle I	900 µl	–	100 µl	–	1000 µl
Leerkontrolle II***	800 µl	–	100 µl	100 µl	1000 µl

* B_O : Gesamtbindung von radioaktivem Hormon an mononukleären Zellen
** Standard : Bindung bei Verdrängung durch unmarkiertes Hormon (= Standard)
***Leerkontrolle II : wurde in der Mehrzahl der Assays weggelassen, da in Vorversuchen kein Unterschied zur Leerkontrolle I festzustellen war.

LEBENSLAUF

Geboren am 23. 3. 1958 in Schwenningen am Neckar als 2. Sohn des Ingenieurs Alfred Kiess und seiner Ehefrau Erika Kiess geb. Schlenker.

1965 - 1968	Besuch der Grundschule in Böblingen
1968 - 1977	Besuch des Goldberg-Gymnasiums in Sindelfingen
1975 - 1977	Vorschüler an der Hochschule für Musik und Darstellende Kunst in Stuttgart
1976 - 1977	Teilnahme und Preise beim Wettbewerb 'Jugend Forscht' (Thema: 'Bakterielle Umweltverschmutzung - Beispiel Kinderspielplätze')
1977	Abitur
1977 - 1979	Medizinstudium an der Universität Tübingen
1979	Physikum
1979 - 1983	Medizinstudium an der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
1980 - 1983	Doktorand bei Herrn Prof. Dr. med. O. Butenandt, Universitätskinderklinik München
1980	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1981	Studienaufenthalt am St 'Thomas' Hospital in London, Dep. of Community Medicine, Dep. of Obstetrics
1982	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1982	Studienaufenthalt an der University of Newcastle-upon-Tyne, Endocrine Unit, Children's Clinic
1983	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung